



Dpto. Biología Celular y Genética

Tesis Doctoral

**Estudio del Mecanismo de Recombinación
Homóloga en Cereales y Caracterización
de Genes Implicados en el Proceso**

Ruth Pérez Vergas

2008

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2003-08128-C02-01); así como a la beca FPI concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (2004-5374).

AGRADECIMIENTOS

Tengo un montón de folios impresos sobre la mesa que resumen todo el trabajo realizado durante algo más de cuatro años. Sin embargo, las cosas más importantes que he aprendido en este tiempo no quedarán plasmadas en ningún papel, pero eso no importa, porque nunca podré olvidar cada uno de los buenos momentos y a cada una de las personas con las que he compartido tanto, y de las que he aprendido mucho más de lo os podéis imaginar.

Gracias a mis directores Alfredo y Nicolás por todo lo que me han enseñado, por la formación que he podido conseguir en este campo que me apasiona y que es la Genética, pero sobre todo, gracias por los buenos momentos compartidos.

A todas las personas con las que he coincidido durante estos cuatro años en el departamento, de cada una me llevo agradables recuerdos y buenos consejos, muchas gracias por todo. Y no me olvidaré nunca de la gente de Karlsruhe, amigos desde el primer día que nos conocimos, que se desvivieron por hacerme sentir como en casa, por supuesto, con mucho éxito.

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, sin duda ellos son los responsables de lo que soy, y de haber podido llegar hasta aquí. Lo mismo puedo decir de Jesús, que ya me acompaña desde hace más de diez años, gracias por tu apoyo en todo momento.

También va dedicado este trabajo a todas las personas que se han interesado por mi trabajo en estos años, a mi familia, especialmente a mi hermano y a mi abuela Esther. Y a mis amigas, *las ladies*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. <i>GENE TARGETING</i>	3
1.1.1. ESTRATEGIAS DE <i>GENE TARGETING</i> EN PLANTAS SUPERIORES	4
➤ Oligonucleótidos quimera ARN/ADN	5
➤ Sistemas de recombinación específica de sitio (<i>SSR, Site-Specific Recombination</i>)	6
➤ Producción de roturas de tipo DSBs en la secuencia diana	7
• Endonucleasas ZNFs (<i>Zinc-Finger Nuclease</i>)	8
➤ Modificación de la expresión de genes implicados en recombinación	9
➤ Sistemas de selección positiva/negativa	10
1.2. DAÑOS EN EL ADN Y SISTEMAS DE REPARACIÓN	10
1.2.1. ROTURAS DE DOBLE CADENA DEL ADN (DSBs)	10
1.2.2. MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DSBs EN EL ADN	11
1.2.2.1. Recombinación Homóloga	12
• Modelo DSBR (<i>Double-Strand Break Repair</i>)	12
• Modelo SDSA (<i>Synthesis Dependent Strand Annealing</i>)	13
• Modelo SSA (<i>Single-Strand Annealing</i>)	15
1.2.2.2. Recombinación Ilegítima: Modelo NHEJ (<i>Non-Homologous End Joining</i>)	16
1.2.3. COMPETENCIA ENTRE LAS VÍAS DE HR Y NHEJ	17
1.3. COMPLEJO MRN (<i>Mre11-Rad50-Nbs1</i>)	18
1.3.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS	19
• Estructura y propiedades de <i>Mre11</i>	19
• Estructura y propiedades de <i>Rad50</i>	20
• Estructura y propiedades de <i>Nbs1</i>	22
1.3.2. FUNCIONES DEL COMPLEJO MRN	23
1.4. IMPORTANCIA DE LOS CEREALES: TRIGO Y CEBADA	28
1.4.1. DESTINO DE LOS GENES DUPLICADOS	30

2. OBJETIVOS	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	41
➤ Material Vegetal	41
➤ Estirpes Bacterianas y de Levaduras	41
3.2. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	41
3.3. AMPLIFICACIONES POR PCR	42
3.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	43
3.5. TRANSFORMACIÓN DE TRIGO MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
3.6. TRANSFORMACIÓN DE LA VARIEDAD DE CEBADA ‘GOLDEN PROMISE’ MEDIADA POR <i>Agrobacterium</i>	44
3.7. ENSAYOS DE SOUTHERN BLOT	45
3.8. ALINEACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	45
3.9. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON FLUORESCENCIA (<i>FISH</i>)	46
3.10. ENSAYOS DE RT-PCR CUANTITATIVA	47
• SYBR Green	48
• Sondas UPL	48
3.11. ENSAYOS DE SSCP (<i>Single Stranded Conformational Polymorphism</i>)	49
3.12. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS	50
• <i>Mre11</i>	50
• <i>Rad50</i>	50
• <i>Nbs1</i>	51
4. RESULTADOS	55
4.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL PARA EL ESTUDIO DEL MECANISMO DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	55
➤ Transformación de las variedades de trigo ‘Chinese Spring’, ‘Florida’, ‘Bobwhite 26’ y ‘Bobwhite 29’	55
➤ Transformación de la variedad de cebada ‘Golden Promise’	58

4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN Y DE INTERACCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO MRN	64
4.2.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	64
4.2.1.1. Caracterización del gen <i>Mre11</i>	65
➤ Caracterización molecular de <i>Mre11</i>	65
➤ Determinación del número de copias génicas	69
4.2.1.2. Caracterización del gen <i>Rad50</i>	70
➤ Caracterización molecular de <i>Rad50</i>	70
➤ Determinación del número de copias génicas	73
➤ Localización cromosómica del gen <i>Rad50</i> en el genoma de trigo	74
4.2.1.3. Caracterización del gen <i>Nbs1</i>	77
➤ Caracterización molecular de <i>Nbs1</i>	77
➤ Determinación del número de copias génicas	79
4.2.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	80
4.2.2.1. Análisis de expresión global mediante PCR cuantitativa	80
➤ Análisis de la expresión de <i>Mre11</i>	81
➤ Análisis de la expresión de <i>Rad50</i>	85
➤ Análisis de la expresión de <i>Nbs1</i>	89
4.2.2.2. Análisis de expresión de genes homeólogos mediante SSCP	93
➤ Desarrollo de una técnica de SSCP modificada	93
➤ Análisis de la expresión del gen <i>Mre11</i> mediante SSCP	97
➤ Análisis de la expresión del gen <i>Rad50</i> mediante SSCP	100
➤ Análisis de la expresión del gen <i>Nbs1</i> mediante SSCP	101
4.2.3. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS	103
➤ Interacciones MRE11-RAD50	104
➤ Interacciones MRE11-NBS1	106
➤ Interacciones RAD50-NBS1	107
➤ Formación de homodímeros MRE11-MRE11, RAD50-RAD50 y NBS1-NBS1	107

5.	DISCUSIÓN	113
5.1.	ESTUDIO DEL MECANISMO DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	113
5.1.1.	OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS	116
5.2.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN Y DE INTERACCIÓN DE LOS GENES <i>Mre11</i> , <i>Rad50</i> y <i>Nbs1</i>	120
5.2.1.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	120
5.2.2.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>Mre11</i> , <i>Rad50</i> y <i>Nbs1</i>	129
5.2.2.1.	Análisis de expresión mediante PCR cuantitativa	130
5.2.2.2.	Análisis de expresión mediante SSCP	136
5.2.3.	ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE DOBLE HÍBRIDO	141
6.	CONCLUSIONES	149
7.	BIBLIOGRAFÍA	155
ANEXO I. AMPLIACIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS		I.3
I.1.	EXTRACCIÓN DE ADN	I.4
I.2.	ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	I.4
	➤ Electroforesis de ADN en geles de agarosa	I.4
	➤ Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes	I.4
	➤ Electroforesis de ADN en geles de acrilamida	I.5
I.3.	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	I.5
I.4.	CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	I.6
	➤ Vectores de Clonación	I.6
	➤ Clonación de fragmentos de extremos romos	I.6
	➤ Clonación de fragmentos de extremos cohesivos	I.7
	➤ Cultivo y transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico	I.7
	➤ Identificación de colonias bacterianas portadoras de plásmidos recombinantes: Ensayo Toothpick	I.9

I.5.	TRANSFORMACIÓN DE TRIGO MEDIADA POR <i>Agrobacterium</i>	I.10
➤	Cultivo y Transformación de la cepa AGL1 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	I.10
➤	Transformación de trigo mediada por <i>Agrobacterium</i>	I.11
I.6.	TRANSFORMACIÓN DE CEBADA MEDIADA POR <i>Agrobacterium</i>	I.14
I.7.	ENSAYOS DE SOUTHERN BLOT	I.18
➤	Marcaje de sondas con digoxigenina mediante PCR	I.19
➤	Southern Blot: Membranas de nylon sin carga	I.19
➤	Southern Blot: Membranas de nylon con carga positiva	I.21
I.8.	HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON FLUORESCENCIA (<i>FISH</i>)	I.23
➤	Obtención de Preparaciones Cromosómicas	I.23
➤	Hibridación	I.24
➤	Amplificación de la señal de hibridación	I.26
➤	Contratinción	I.26
➤	Rehibridación de las preparaciones con pTa794	I.26
I.9.	ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS	I.27
➤	Cultivo y transformación de <i>S. cerevisiae</i>	I.27
➤	Ensayos de Doble Híbrido en Levaduras	I.29
➤	Componentes del Sistema	I.29
➤	Medios de selección para el control de transformaciones	I.30
➤	Detección de interacciones: genes delatores	I.31
ANEXO II. OLIGONUCLEÓTIDOS		II.3
II.1.	OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS SOBRE <i>Mre11</i>	II.3
II.2.	OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS SOBRE <i>Rad50</i>	II.4
II.3.	OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS SOBRE <i>Nbs1</i>	II.7
II.4.	OLIGONUCLEÓTIDOS CON OTROS USOS	II.8
ANEXO III. ALINEAMIENTO DE PROTEÍNAS		III.3
III.1.	ALINEAMIENTO DE PROTEÍNAS RAD50	III.3
III.2.	ALINEAMIENTO DE PROTEÍNAS RAD50	III.5
III.3.	ALINEAMIENTO DE PROTEÍNAS NBS1	III.8

ANEXO IV. PUBLICACIÓN	IV.3
ANEXO V. SUMMARY	V.3

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético
ABC	Dominio de unión a ATP
AD	Dominio de activación de la transcripción
APS	Persulfato amónico
BD	Dominio de unión
BRCT	Dominio <i>Breast Cancer C-Terminus</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DSB	Rotura de la doble cadena de ADN
DSBR	Modelo de reparación de roturas de la doble cadena de ADN
DTT	Ditio-treitol
FHA	Dominio <i>Forkhead associated</i>
GH	Grupo de homología
HMW	Subunidades de alto peso molecular
HR	Recombinación homóloga
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
LSS	Lauril sulfato de sodio
M ₂ R ₂	Heterotetrámero formado por un dímero MRE11 y otro RAD50
MES	Ácido morfolino 2-N etanosulfónico
MOPS	Ácido morfolino-propanosulfónico
MS	Medio <i>Murashige & Skoog</i>
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
NOR	Región de organización nucleolar
RT	Retrotranscripción
SDSA	Modelo de alineamiento de cadena dependiente de síntesis
SQ	Motivo formado por un residuo de serina seguido por una glutamina
SSA	Modelo de alineamiento de cadena sencilla
SSCP	Polimorfismo en la conformación de cadena sencilla
SSR	Recombinación específica de sitio
UP	Ultra pura
UPL	<i>Universal probe library</i>
UTR	Región no traducida
ZF	Motivo dedo de zinc
ZFN	Nucleasa de dedo de zinc

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de la mejora genética vegetal es el de obtener nuevos y mejorados cultivares de élite. Además de las técnicas tradicionales de cruzamiento y selección, en los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías basadas en los avances de la biología molecular que tratan de complementar los métodos convencionales de la mejora genética de plantas, entre las que destaca la técnica de transformación genética o transgénesis. En este sentido sería de crucial importancia disponer de la habilidad para modificar un gen *in situ* o integrar un transgén en una posición específica del genoma de una célula somática de una forma controlada vía recombinación homóloga, lo que se ha denominado *gene targeting*.

La recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*) es el principal modo de integración del ADN transformante o exógeno en bacterias y eucariotas inferiores. Sin embargo, en eucariotas superiores, incluidas las plantas, el ADN introducido mediante este tipo de técnicas se integra principalmente por recombinación ilegítima; es decir, en posiciones no homólogas y en principio aleatorias dentro del genoma receptor.

1.1. GENE TARGETING

En los procesos de *gene targeting* el fragmento integrado bien puede ser un gen inexistente previamente en el organismo o bien un fragmento homólogo a un gen endógeno, el cual se utiliza para modificar *in situ* el gen original. La alteración de genes en su ambiente natural es una potente herramienta con la cual estudiar la función de estos genes, y modificar genéticamente los organismos. Aunque la introducción de genes mediante *gene targeting* vía recombinación homóloga es una práctica común en levaduras y células procariotas, así como en células madre (troncales o *stem cells*) de ratones, su eficiencia en plantas superiores no es aún suficiente como para su empleo de forma rutinaria.

La integración de las moléculas de ADN exógeno en el genoma tiene lugar como consecuencia de mecanismos de rotura y reparación cromosómica. En plantas, normalmente esta integración se produce mediante una unión de extremos que es

independiente de la secuencia, o bien en zonas con microhomologías, a través de un proceso de recombinación ilegítima, también conocido como NHEJ (*Non-Homologous End Joining*). Por el contrario, para la recombinación homóloga se necesitan grandes regiones con identidad de secuencia para guiar el proceso de recombinación, siendo por ello una condición necesaria para alcanzar el *gene targeting*.

Hasta el momento, las frecuencias de *gene targeting* obtenido en plantas superiores han sido muy bajas, del orden de 10^{-5} a 10^{-7} , independientemente del tejido transformado, la especie de planta y el método de transformación utilizado (Bray y West, 2005; Cotsaftis y Guiderdoni, 2005; Iida y Terada, 2005; Kumar y col., 2006; Puchta, 2003, 2005; Puchta y Hohn, 2005; Shaked y col., 2005; Wright y col., 2005). El principal obstáculo para desarrollar una estrategia efectiva de *gene targeting* en plantas superiores, lo representa la alta tasa de integración ilegítima de los transgenes mediante NHEJ. A ello se añade, en el caso de cereales, el problema de la dificultad de obtener plantas transgénicas, así como la mala regeneración de los tejidos transformados en muchos casos.

Se ha visto que la integración de transgenes por la vía de la recombinación homóloga es estimulada por la formación de roturas de la doble cadena del ADN (*DSBs*, *Double-Strand Breaks*), pero en este sentido existe la dificultad de dirigir la formación de estas roturas en un punto concreto del genoma (Puchta y col., 1993). Por ello, el reto del *gene targeting* ha tomado una doble vertiente, por un lado conseguir mediante distintas estrategias que la integración ocurra preferentemente vía recombinación homóloga y no mediante NHEJ, y por otro, desarrollar las herramientas para crear roturas en la doble cadena del ADN en dianas concretas del genoma

1.1.1. ESTRATEGIAS DE *GENE TARGETING* EN PLANTAS SUPERIORES

Considerando los factores que mejoraron las frecuencias de *gene targeting* en células madre de ratones, se han realizado varias aproximaciones experimentales para mejorar la frecuencia de la recombinación homóloga frente a la ilegítima en plantas superiores. Sin embargo, ni el aumento de la longitud de la región de homología en el ADN transferido,

ni la incorporación de marcadores seleccionables negativos se ha resuelto en un incremento significativo de la frecuencia de *gene targeting* en plantas.

Debido a esto se han diseñado otras estrategias con el fin de obtener un aumento significativo de la frecuencia de *gene targeting*, entre las cuales se puede destacar el uso de oligonucleótidos quimera de ARN/ADN, los sistemas de recombinación *cre-loxP*, la inducción de roturas de tipo DSBs en puntos concretos del genoma, o el uso de sistemas genéticos participantes tanto en procesos de recombinación homóloga como en NHEJ. Además se ha desarrollado un sistema efectivo de selección positiva/negativa de los eventos de recombinación.

Oligonucleótidos quimera ARN/ADN

La observación de que la transcripción favorece la recombinación homóloga ha llevado a la especulación de que la presencia de un ARN complementario a la secuencia diana puede potenciar las reacciones de apareamiento de ADN (Puchta, 2003).

Este tipo de estrategia está orientada más a la modificación de genes endógenos que a la introducción dirigida de genes exógenos ya que el *gene targeting* dirigido por oligonucleótidos quimera ARN/ADN permite generar mutaciones puntuales en sitios específicos de genes individuales y familias multigénicas. Estos oligonucleótidos constan de una región de “ADN *mutador*” de cinco nucleótidos complementarios a la región diana, flanqueados por puentes de 2'-O-metil ARN de 8 a 12 nucleótidos cada uno. La región del “ADN *mutador*” incluye la mutación que se desea introducir en el gen endógeno. Todo esto a su vez está flanqueado por horquillas de tres o cuatro nucleótidos de timina que conectan con una región de ADN de unos 30 nucleótidos, totalmente complementarias a la cadena anterior de ADN/ARN. El mecanismo de acción propuesto implica la formación de un lazo estabilizado por complementación con la secuencia diana y que actúa como molde para la reparación del heterodúplex intermediario, introduciendo entonces la base mutada (Iida y Terada, 2005).

Estos oligonucleótidos son introducidos por biolística en células de plantas y embriones inmaduros, o por electroporación de protoplastos. La frecuencia de conversión génica que se ha obtenido en plantas superiores empleando estos oligonucleótidos está entre 10^{-4} y 10^{-6} (Beetham y col., 1999; Kochevenko y Willmitzer, 2003). Así por ejemplo, se ha modificado el gen que codifica para la enzima acetolactato sintasa (ALS)

Introducción

del arroz mediante la sustitución de tres bases en diferentes codones del gen, lo que ha permitido obtener plantas de arroz con resistencia a distintos herbicidas (Okuzaki y Toriyama, 2004).

Sistemas de recombinación específica de sitio (SSR, *Site-Specific Recombination*)

El sistema Cre/loxP del bacteriófago P1 es uno de los sistemas SSR más estudiados hasta la fecha. Este sistema consta de dos componentes: por un lado dos sitios loxP que son regiones de 34 pb formadas por dos repeticiones invertidas de 13 pb separadas por una secuencia espaciadora asimétrica de 8 pb que es lo que da la direccionalidad del sitio loxP. Los dos sitios están normalmente clonados en orientación directa, flanqueando una secuencia de ADN. El segundo componente es el gen cre codificante para la recombinasa Cre, que se une específicamente a los sitios loxP produciendo la recombinación entre estos sitios y eliminando la secuencia entre ambos (Arumugan y col., 2007; Ream y col., 2005; Sauer, 1998).

La orientación relativa de los sitios diana loxP uno con respecto al otro determina el resultado del proceso de recombinación (*Figura 1.1*): se puede producir la pérdida de la secuencia situada entre dos repeticiones directas en forma de molécula circular, o integrar una molécula circular en una lineal (*IA*); o se puede invertir el ADN entre dos sitios loxP invertidos (*IB*). Aunque en baja frecuencia, también se podría producir intercambio de secuencias presentes en dos moléculas distintas de ADN (*IC*) (Branda y Dymecky, 2004; Ream y col., 2005).

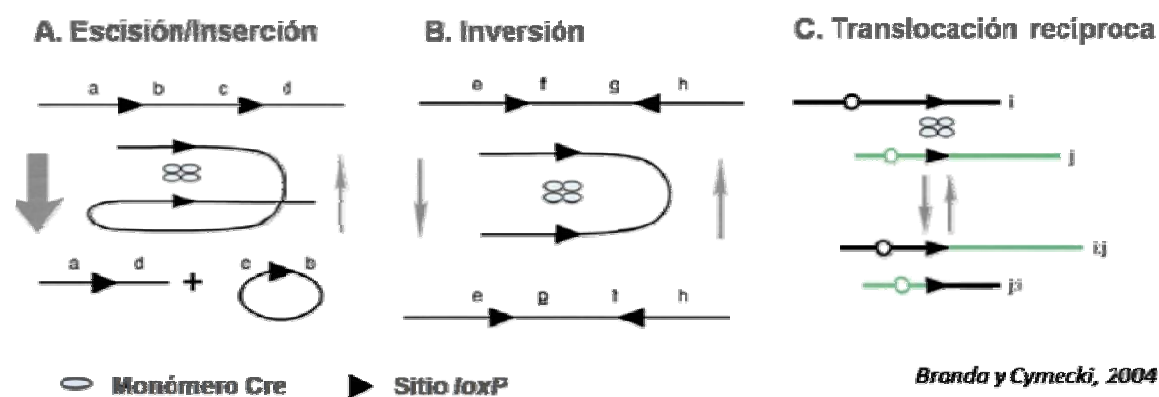


Figura 1.1 Resultado del proceso de recombinación entre dos sitios loxP por acción de la recombinasa Cre, en función de la orientación y localización de estos sitios de reconocimiento.

Este sistema se ha empleado para la retirada de los genes marcadores o de selección tras los procesos de transgénesis. El gen marcador estaría comprendido entre dos sitios *loxP* de forma que tras la expresión de la recombinasa Cre se produciría la recombinación entre estos sitios quedando el gen marcador fuera del cromosoma (Li Z. y col., 2007; Sreekala y col., 2005). Así mismo, se ha empleado en ratones para introducir lo que se han denominado como casetes *STOP* entre el promotor y el transgén. De este modo el transgén permanece “dormido” hasta que es activado en la línea transgénica por acción de la recombinasa Cre que elimina esta secuencia intermedia (Sauer, 1998). En cultivos celulares de mamíferos y en levaduras, se han usado estos sistemas para la inserción específica de una secuencia flanqueada por sitios *loxP* presente en un plásmido, en una diana *loxP* integrada en el cromosoma. La diana *loxP* debe haber sido introducida previamente en el cromosoma, y una vez logrado esto se obtiene un sistema con el que trabajar posteriormente, en el que se podrían introducir nuevas construcciones mediante HR mediada por la recombinasa Cre. Esto permite llevar a cabo distintas integraciones dentro de un mismo locus en el genoma (Verweire y col., 2007; Wirth y col., 2007). El mayor obstáculo para realizar *gene targeting* mediante el sistema aquí descrito consiste en dirigir la integración de la construcción de partida en el punto deseado dentro del cromosoma.

Producción de roturas de tipo DSBs en la secuencia diana

Se ha visto que una de las formas más efectivas para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga es crear roturas de doble cadena en los sitios diana del cromosoma destinatario (Puchta, 1993). La rotura estimula el sistema de reparación de ADN celular y en presencia de un molde homólogo se puede producir la reparación a través de recombinación homóloga.

En un trabajo previo de Puchta y col., (1996) se obtuvo un incremento de dos o tres órdenes de magnitud en la frecuencia de recombinación homóloga entre el locus cromosómico y el T-DNA transformante en tabaco mediante el corte de las dianas cromosómicas con la endonucleasa I-*SceI*, alcanzándose frecuencias de recombinación homóloga en torno a 10^{-2} y 10^{-3} . También se ha visto que la rotura cromosómica inducida por transposones favorece la recombinación, como se describe en el trabajo de Xiao y Peterson (2000), en el que se consigue un incremento de la recombinación somática

Introducción

intracromosomal en *Arabidopsis* del orden de 1000 veces con la escisión del transposón Ac/Ds, obteniendo tasas de recombinación homóloga de entre 10^{-3} a 10^{-4} .

Todas estas aproximaciones no obstante, tienen un bajo nivel práctico ya que esta estrategia implica crear previamente en el genoma de la planta sitios diana para las enzimas utilizadas o bien utilizar elementos transponibles que se insertan al azar en el genoma, sin estar por lo tanto dirigidos a genes endógenos.

Endonucleasas ZFNs (*Zinc-Finger Nuclease*)

Debido a los problemas comentados anteriormente, son muchos los grupos que actualmente están trabajando con las endonucleasas ZFNs (*Zinc-Finger Nuclease*) para dirigir la formación roturas de tipo DSB en secuencias específicas del genoma, llegándose a obtener frecuencias de *gene targeting* en torno a 10^{-3} (Kumar y col., 2006).

Estas proteínas son enzimas artificiales construidas a partir de la unión de motivos “dedo de zinc” y dominios endonucleasa no específicos. La idea es poder diseñar enzimas capaces de unirse a secuencias específicas del ADN y cortarlas. Para ello se pueden construir proteínas con dedos de zinc determinados que se van a unir a la secuencia del ADN que se quiere modificar. Si además estos dominios de dedo de zinc están unidos a dominios de tipo endonucleasa que producen cortes en el ADN de doble cadena, se podrán producir cortes controlados en cualquier parte del genoma. Así, cada motivo comprende generalmente unos 30 aminoácidos que reconocen un triplete específico de ADN. Es necesario que se produzca la dimerización de dos nucleasas ZFNs para la activación de la actividad endonucleasa, a través de dos sitios de reconocimiento en orientación invertida flanqueados por un espaciador de 6 bases (*Figura 1.2*) (Kumar y col., 2006; Wright y col., 2005).

La naturaleza modular de las proteínas ZFN ofrece un atractivo campo de trabajo para el diseño de nuevas ZFNs, confeccionando secuencias específicas de corte. Actualmente hay dominios *zinc-finger* capaces de reconocer todos los tripletes GNN y ANN, y algunos CNN y TNN, con lo que se pueden generar múltiples combinaciones para el reconocimiento de secuencias específicas. No obstante, existen algunos problemas técnicos aún no resueltos que impiden que estas endonucleasas puedan ser utilizadas de manera habitual.

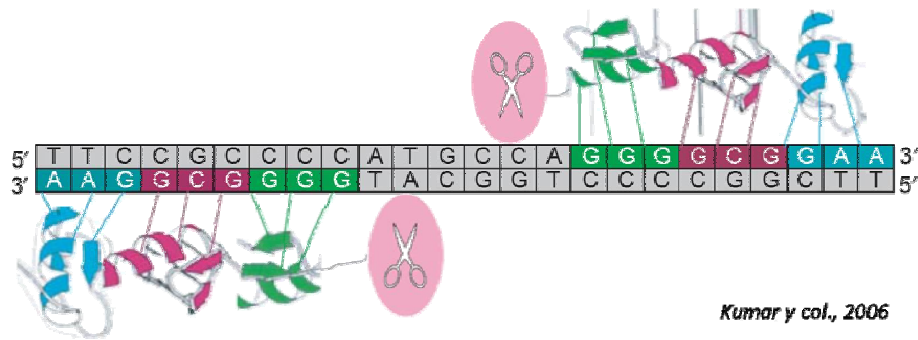


Figura 1.2 Representación esquemática de una nucleasa ZFN de tres dedos de zinc. Son necesarios dos sitios de reconocimiento de 9 pb en orientación invertida. Aunque se pueden diseñar ZF capaces de reconocer una amplia variedad de secuencias, son las de tipo 5' NNCNNCNC(N)₄₋₆GNNGNNGNN 3' las de mayor especificidad.

Modificación de la expresión de genes implicados en recombinación

En la mayoría de los tejidos de vertebrados y en todas las plantas superiores, los transgenes se integran vía NHEJ, dando lugar a inserciones aleatorias de genes. Probablemente, esto sea debido al patrón de expresión de genes implicados en el proceso de reparación de roturas. En general, las levaduras, plantas y vertebrados poseen la habilidad de reparar estas roturas, o de integrar transgenes vía recombinación homóloga y por NHEJ, pero la elección de estas vías es variable y dependiente de algunos genes reguladores. Por lo tanto, la modificación del patrón de expresión de estos genes podría conducir a una variación en la vía utilizada para la integración de los transgenes.

Entre los trabajos realizados en este aspecto cabe destacar aquellos en los que se ha trabajado con genes de organismos con alta eficiencia de *gene targeting*, como es en el caso de la expresión de los genes *RecA* y *RuvC* de *Escherichia coli* en tabaco (Reiss y col., 1996; Shalev y col., 1999), en los que se consiguió incrementar la frecuencia de recombinación homóloga en torno a 10-12 veces. *RecA* tiene la función de unirse a ADN de cadena sencilla y buscar zonas de homología en ADN duplexo; *RuvC* es una nucleasa que resuelve los intermediarios (*Holliday junctions*) formados en el proceso de recombinación. En este mismo sentido, la sobreexpresión de genes que actúan en el proceso de recombinación homóloga puede provocar aumentos de la frecuencia de la misma en células somáticas de organismos superiores, como se ha visto al introducir copias del gen *RAD54*, gen específico de HR de levaduras, en *Arabidopsis* (Shaked y col., 2005). De igual manera, la anulación de la expresión de genes como *Ku70*, *Ku80* y *LigIV*,

que participan en NHEJ podrían favorecer que la reparación de las DSBs se produjera por HR (Pierce y col., 2001).

Sistemas de selección positiva/negativa

Para facilitar la identificación de HR, se han desarrollado estrategias de selección con el fin de detectar las escasas ocasiones en las que se produce recombinación homóloga en el conjunto de los productos obtenidos por recombinación ilegítima. De este modo, una metodología consiste en la incorporación de genes marcadores de selección negativa en el ADN, de manera que estos genes se pierden únicamente en las células en las que se produce HR permitiendo su desarrollo, mientras que serían activos en las células en las que se produce recombinación ilegítima, produciendo su muerte (Hohn y Puchta, 2003).

1.2. DAÑOS EN EL ADN Y SISTEMAS DE REPARACIÓN

Ya que los procesos implicados en la integración de ADN extraño son básicamente idénticos a aquellos responsables de la reparación de las roturas de tipo DSB, un mayor conocimiento del proceso de recombinación desencadenado por la rotura en el ADN sería la base para mejorar la eficiencia de *gene targeting* en plantas.

La recombinación homóloga es la principal vía de reparación de roturas en la doble cadena del ADN en levaduras y procariotas, a diferencia de lo que ocurre en eucariotas superiores en los que es el mecanismo de NHEJ el que predomina en la reparación de estas lesiones. Esto tiene un gran impacto en la mejora genética de plantas cultivadas, ya que el mecanismo predominante para la reparación de DSBs es también el usado para la integración del ADN foráneo.

1.2.1. ROTURAS DE DOBLE CADENA DEL ADN (DSBs)

El genoma de cualquier organismo está expuesto a una amplia variedad de agentes causantes de estrés genotóxico, tanto agentes endógenos (intracelulares) como ambientales. Las consecuencias biológicas que pueden tener estos agentes sobre el genoma van a depender de la naturaleza química de la alteración y, en último caso, la

toxicidad o mutagénesis del daño va a depender de la eficiencia de los mecanismos celulares implicados en la detección, el reconocimiento y la eliminación de este daño, y de su precisión a la hora de reparar las lesiones.

Las roturas en la doble cadena de ADN están entre las formas más citotóxicas de daño del ADN, y pueden dar lugar a aberraciones cromosómicas e inestabilidad del genoma. Aunque estas roturas pueden originarse en un genoma por distintas causas como la radiación ionizante o diferentes agentes químicos, la principal causa de la aparición de DSBs en una célula suele ser la proliferación de errores durante la replicación del ADN, ya que este proceso puede convertir una rotura de cadena simple en una DSB. La reparación errónea o la ausencia de reparación pueden llevar a graves alteraciones en el genoma, con lo que la adecuada reparación de éstas es fundamental para el mantenimiento de la integridad del genoma.

1.2.2. MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DSBs EN EL ADN

Las roturas de tipo DSB en el ADN pueden ser reparadas fundamentalmente a través de dos mecanismos: mediante recombinación homóloga (HR), o mediante recombinación ilegítima (NHEJ).

La reparación mediante recombinación homóloga requiere grandes tramos de secuencias homólogas, que serán empleados como molde para la reparación del daño. En el mecanismo de reparación mediante NHEJ se unen los extremos de ADN originados tras la rotura, los cuales tienen muy poca o ninguna homología, de forma no conservativa, y en algunos casos perdiendo información genética. Por ello, el mecanismo de NHEJ debe ser regulado con precisión para mantener la integridad del genoma.

Aunque frecuentemente se refiere a las vías de NHEJ y HR como propensa al error y libre de errores, respectivamente, esto no deja de ser una simplificación. Las roturas “limpias” con extremos complementarios pueden ser reparadas mediante NHEJ perfectamente, de hecho en mamíferos más del 50% de las DSBs producidas por nucleasas son reparadas mediante NHEJ sin introducir errores en la secuencia. En otros casos, se emplean microhomologías que suponen pequeñas deleciones o inserciones. En el caso de reparación mediante HR, si el molde empleado en la reparación es

completamente homólogo, la precisión suele ser del 100%. Sin embargo, con excepción de las cromátidas hermanas, el resto de moldes no son perfectamente homólogos, produciéndose en muchos casos procesos de conversión génica (Shrivastav y col., 2008).

1.2.2.1. Recombinación Homóloga

Existen tres modelos de recombinación homóloga, los cuales están basados en gran medida en los estudios llevados a cabo en levaduras (Bray y West, 2005; Britt y May, 2005; Puchta, 2005).

Modelo DSB (Double-Strand Break Repair)

Este es el modelo que explica la recombinación meiótica. El proceso se inicia con una rotura en el ADN de tipo DSB y supone la formación de uniones *Holliday* como intermediarios, produciendo cruzamientos entre cromosomas homólogos alineados, más que entre cromátidas hermanas.

En meiosis, las DSBs en el ADN se producen por la proteína SPO11, y estas roturas son reparadas únicamente mediante la vía de recombinación homóloga, usando la secuencia del cromosoma homólogo. SPO11 se une covalentemente a los extremos 5' del ADN, de manera que el siguiente paso es la formación de una mella en el ADN próxima al lugar de la rotura, con la consiguiente liberación de la proteína SPO11 junto con unos pocos nucleótidos. Para llevar a cabo esta liberación se requiere la acción, entre otras, de las proteínas MRE11 y RAD50, integrantes del complejo MRN. Tras el corte en el ADN y la liberación de SPO11, se generan colas de ADN de cadena sencilla de extremo 3', proceso que está mediado por una nucleasa aún no identificada, y también se ha implicado aquí al complejo MRN. Estas colas son cubiertas por la proteína RPA (*Replication Protein A*) y por RAD51, la cual forma unos filamentos que promueven la búsqueda de zonas de homología y la invasión de la hebra (*Figura 1.3*). Tras la síntesis del ADN empleando como molde esta región homóloga, la cadena invasora es liberada y se liga con el otro extremo de la rotura, resultando en la formación de una molécula unida a través de dos uniones *Holliday* (*Figura 1.4*).

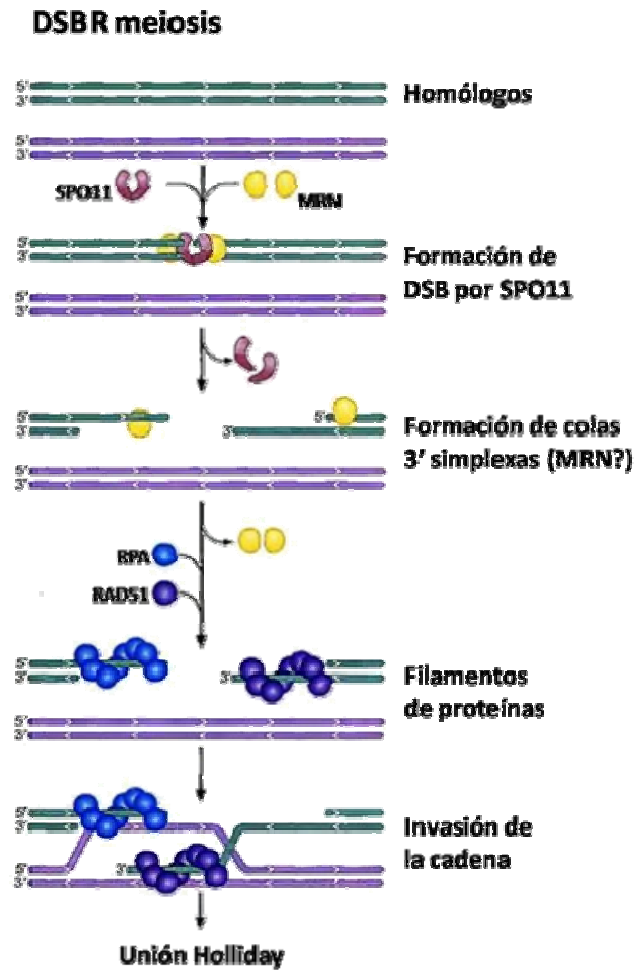


Figura 1.3 Esquema del modelo DSBR que explica el mecanismo de recombinación en meiosis.

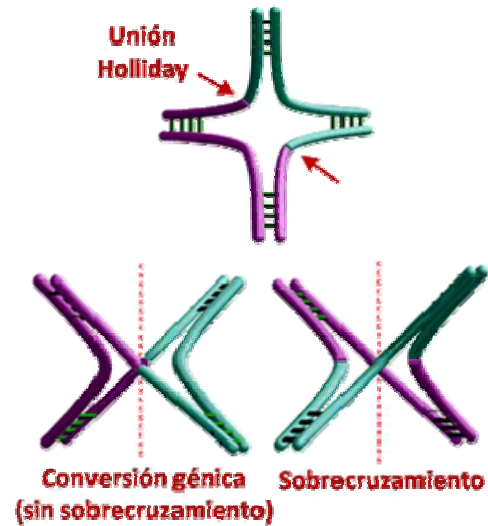


Figura 1.4 La unión Holliday, se produce cuando dos moléculas duplexas de ADN implicadas en la recombinación se intercambian en una región de homología para dar lugar a una estructura ramificada que tiene cuatro brazos duplexos. Dependiendo de la orientación del corte, las uniones Holliday se pueden resolver por conversión génica, donde las dos moléculas de ADN mantienen sus secuencias flanqueantes, o por sobrecruzamiento, donde estas secuencias se intercambian.

Aunque estos intercambios son necesarios para la correcta segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis, podrían ser peligrosos durante la reparación de DSB en células somáticas, si se produce entre cromosomas o cromatidios no alineados, o entre secuencias repetidas dispersas, pudiendo generarse deleciones, duplicaciones o translocaciones.

Modelo SDSA (*Synthesis-Dependent Strand Annealing*)

Este modelo de reparación juega un papel importante en la reparación de las roturas de tipo DSB en células somáticas, pudiendo usar como sustrato para la recombinación una cromátida hermana, cromosomas homólogos, o una región ectópica de homología en el genoma.

Introducción

Igual que en el modelo anterior, la reparación es iniciada por una digestión del extremo 5' formando una larga cola de ADN de cadena sencilla 3', que invade un dúplex homólogo y ceba la síntesis de ADN (*Figura 1.5A*). En contraste con el modelo DSB, el ADN sintetizado de nuevo se re-alinea con la otra parte de la rotura, reparando la rotura y reduciendo la probabilidad de formación de uniones *Holliday* y de sobrecruzamientos, los cuales podrían ser altamente mutagenéticos si esta reparación ocurre entre regiones ectópicas con menor homología. No obstante, la formación de uniones *Holliday* puede ocurrir durante la reparación SDSA, y los sobrecruzamientos podrían no ser mutagénicos si se restringen a cromátidas hermanas.

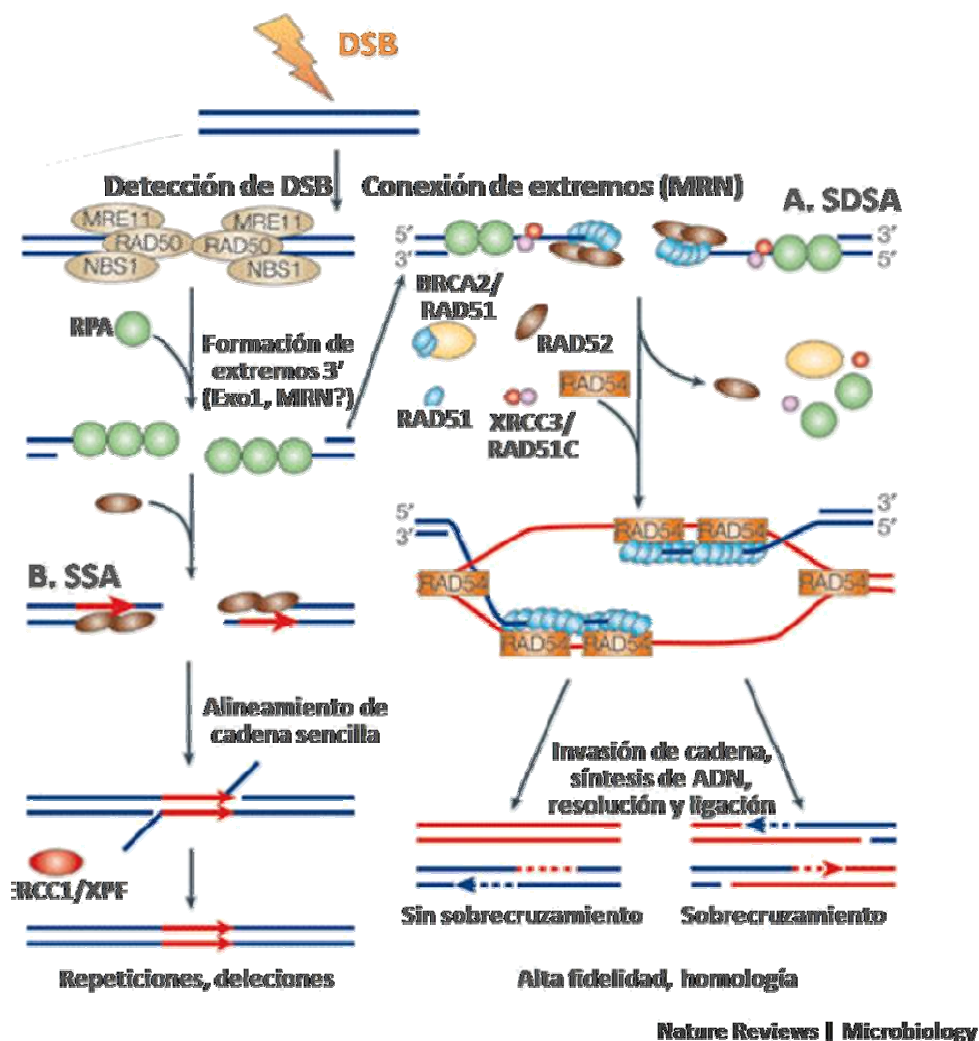


Figura 1.5 Vías de reparación de DSBs en células somáticas. La HR es iniciada por una digestión del extremo 5', formando largas colas 3' las cuales son cubiertas por la proteína RPA. (A) En el modelo de SDSA la formación de filamentos de RAD51 promueve la búsqueda de homología y la invasión de la hebra, pudiendo formarse uniones Holliday. (B) En el modelo SSA se toma como molde para la reparación repeticiones homólogas próximas al lugar de la rotura, con pérdida de la información situada entre estas repeticiones.

Ambos mecanismos de recombinación homóloga, SDSA y DSBR, pueden operar en células somáticas y meióticas, aunque la frecuencia relativa será diferente en los distintos tipos celulares, predominando la vía de DSBR en células meióticas, mientras que en células somáticas opera en mayor medida como mecanismo de reparación la vía SDSA (Bray y West, 2005).

Modelo SSA (Single-Strand Annealing)

Este tercer mecanismo de recombinación homóloga funciona cuando se producen roturas de tipo DSB en regiones con secuencias repetidas. Igual que en los modelos anteriores, una exonucleasa con actividad $5' \rightarrow 3'$ actúa formando colas simplexas $3'$, que en este caso se alinean con las regiones homólogas proporcionadas por las secuencias repetidas. El modelo SSA describe una reacción no conservativa, ya que da lugar a la pérdida de la información situada entre las repeticiones alineadas una vez que se repara la rotura (Figura 1.5B).

Hay evidencias de que estas tres vías de recombinación homóloga están actuando en plantas, y el convencimiento creciente de que gran parte de la maquinaria molecular es común entre los diferentes mecanismos de recombinación homóloga (Puchta, 2005; Schuermann y col., 2005). Las frecuencias de recombinación van a variar enormemente, dependiendo del origen de las secuencias receptoras y donadoras. En células somáticas de plantas, la reparación de DSBs en el ADN mediada por recombinación homóloga ocurre rara vez, aproximadamente en uno de cada 100.000 acontecimientos de reparación. Las frecuencias son similares, entre 10^{-5} y 10^{-7} , en la reparación de DSBs cuando se utilizan secuencias ectópicas homólogas. Esto indica que, al menos en células en fase G_1 del ciclo celular, la recombinación homóloga juega un papel muy minoritario en la reparación de estas roturas en plantas (Puchta, 1999). En cualquier caso, en situaciones donde se encuentran secuencias homólogas disponibles próximas al lugar de rotura, como por ejemplo si la rotura ocurre entre repeticiones en tándem, hasta una tercera parte de estas roturas son reparadas vía SSA, y aproximadamente un 7% por SDSA (Orel y col., 2003; Siebert y Puchta, 2002).

1.2.2.2. Recombinación Ilegítima: Modelo NHEJ (*Non-Homologous End Joining*)

Ésta es la vía mayoritaria de reparación de roturas de tipo DSB en las células somáticas de eucariotas superiores. Según este modelo, los extremos generados tras una DSB serían religados sin necesidad de la presencia de una secuencia homóloga que se emplee como molde. Se dice que éste es un mecanismo propenso al error, pudiendo producir en ciertos casos cambios en el genoma tales como deleciones, inserciones o diferentes tipos de reordenaciones.

El reconocimiento inicial de la rotura parece ser mediado por el complejo heterodímero Ku70/Ku80, el cual participa en varios aspectos del metabolismo de extremos de ADN en células eucariotas, entre ellos el procesamiento de telómeros. Este complejo se une a los extremos de ADN atrayendo a la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs), activándose su actividad kinasa. La ligación es catalizada por el complejo ADN ligasa IV, formado por la ligasa IV y su cofactor XRCC4. En este proceso también se implican los componentes MRE11 y RAD50 del complejo MRN, que parece que tendrían una función estructural acercando ambos extremos de ADN. En este caso, los extremos son mínimamente procesados para revelar pequeños tramos de complementariedad, y el ADN sobrante es eliminado por una nucleasa, o rellenado por una ADN polimerasa (*Figura 1.6*) (van Gent y van der Burg, 2007; Weterings y Chen, 2008).

Algunos trabajos señalan que la reparación mediante NHEJ es llevada a cabo a través del alineamiento de microhomologías de 3-5 pb localizadas en ambos extremos implicados en la reparación. Una diferencia entre los mecanismos de NHEJ y SSA en plantas podría ser la longitud de esas homologías. Mientras que en NHEJ es llevada a cabo en sitios de microhomologías, de incluso una sola base, el mecanismo de SSA requiere una homología de gran tamaño. El aspecto común en ambos casos es la pérdida de información genética contenida entre las repeticiones. No obstante, los acontecimientos de HR intracromosómicos y extracromosómicos ligados a repeticiones directas cromosómicas se explican por reparación mediada por SSA en plantas superiores (Bray y West, 2005).

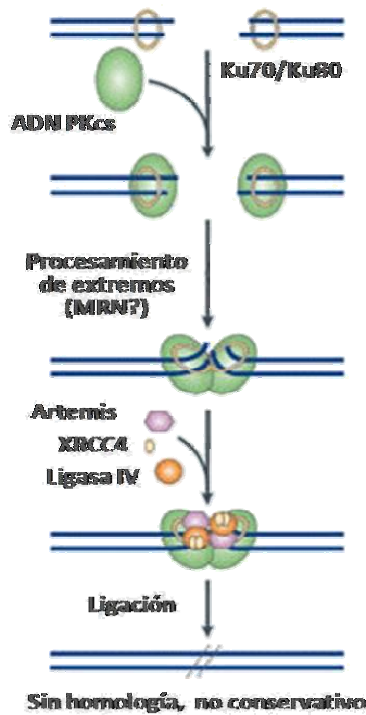


Figura 1.6 Modelo de reparación mediante NHEJ. El complejo Ku70/Ku80 se une a los extremos expuestos de ADN que son procesados antes de la ligación por LIG4/XRCC4. Parece que el complejo MRN estaría implicado de algún modo en el procesamiento de los extremos antes de esta ligación.

1.2.3. COMPETENCIA ENTRE LAS VÍAS DE HR Y NHEJ

Los extremos de ADN originados tras una rotura de tipo DSB servirían como sustrato para el complejo multienzimático MRE11/RAD50/NBS1, que en un primer momento tendría una función de señalización de la rotura. La posterior interacción de estos extremos con RAD51 lleva al ensamblaje de otro complejo multienzimático, el cual finalmente conduce a la reparación dependiente de homología mediante DSBR o SDSA. Si RAD51 no está disponible, el heterodímero Ku70/Ku80 se une a los extremos de ADN, permitiendo el reclutamiento de la ADN ligasa IV y su cofactor XRCC4. En este último caso, los extremos de ADN son unidos vía NHEJ. De acuerdo con este modelo las vías DSBR, SDSA y NHEJ competiría por los extremos de ADN, lo que se refleja a nivel molecular en la competencia entre RAD51 por un lado y Ku70/Ku80 por otro (Hohe y Reski, 2003; Li J. y col., 2007).

El hecho de que estas dos vías puedan competir una con otra se ha usado para incrementar la eficiencia de *gene targeting* en hongos. Se ha visto que también en mamíferos, defectos en las proteínas implicadas en el proceso de NHEJ pueden hacer que se favorezca la vía de HR.

Algunos estudios señalan la fase del ciclo celular como un factor que modula la elección de la vía de reparación. Así, en algunos casos se ha visto que la reparación mediante HR predomina tras la inducción de DSBs en fase S tardía/G2, mientras que la vía de NHEJ sería la elegida predominantemente en fase G1/S temprana. Esto concuerda con el hecho de que es tras la fase S cuando está presente la cromátida hermana para ser usada como sustrato de recombinación. Sin embargo, son muchos los factores que influyen en la elección de la vía de reparación. También parece que en la elección del sistema de reparación podría influir la estructura de los extremos generados tras la rotura.

1.3. COMPLEJO MRN (*Mre11-Rad50-Nbs1*)

Los sistemas genéticos que participan en los procesos de reparación y recombinación del ADN se han estudiado durante muchos años en múltiples organismos, incluyendo bacterias y levaduras, y también en células de mamíferos y plantas. Estos estudios han permitido desvelar las bases de los mecanismos moleculares que actúan en estos procesos, demostrándose por un lado una conservación de estos mecanismos en la evolución, y por otro lado, claras diferencias en su regulación entre los diferentes organismos. Aunque se han caracterizado un gran número de genes que intervienen en estos procesos en levaduras y humanos principalmente, en plantas superiores sólo los análisis funcionales de los genes homólogos implicados en los procesos de recombinación podrían explicar la baja eficiencia del *gene targeting* (Cotsaftis y Guiderdoni, 2005).

El complejo MRN, integrado por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 (XRS2 en levaduras), es una pieza fundamental en la respuesta celular a roturas de tipo DSB y está involucrado en prácticamente todos los aspectos del metabolismo de extremos de ADN, incluyendo detección de DSBs, procesamiento de las DSBs, recombinación homóloga y meiosis, NHEJ, mantenimiento de los telómeros y activación de la respuesta de puntos de control del ciclo celular activados por DSBs (Assenmacher y Hopfner, 2004; Van den Bosch y col., 2003). Este caleidoscopio de funciones se explica con el hallazgo de que el complejo MRN combina varias actividades, tanto enzimáticas como arquitectónicas y estructurales, incluyendo el procesamiento de los extremos de ADN, la cohesión de ADN y la activación de kinasas de puntos de control relacionados con el gen ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*).

De los tres componentes del complejo MRN, los genes *Mre11* y *Rad50* se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas y están muy conservados en la evolución. La tercera subunidad génica del complejo MRN en eucariotas es *Nbs1* (*Xrs2* es su ortólogo en *S. cerevisiae*), está mucho menos conservada y sólo se han encontrado genes ortólogos en eucariotas, aunque con grandes diferencias en cuanto a su secuencia (Assenmacher y Hopfner, 2004; Van den Bosch y col., 2003; Williams y col., 2007).

De estos genes se conocen las propiedades y estructura, especialmente en levadura y en el hombre, pero falta por conocer las características moleculares, el grado de conservación y actividad en plantas, entre ellas en los cereales, con respecto a las presentes en otras especies eucariotas.

1.3.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Estructura y propiedades de Mre11

El gen *Mre11* codifica para una proteína de unión a ADN, que contiene cuatro motivos fosfoesterasa conservados en su región N- terminal, que coordinan dos iones Mn^{2+} , responsables de la actividad nucleasa del complejo. También contiene dos dominios de unión a ADN, uno conservado en el centro de la proteína y otro menos conservado en el extremo C- terminal; un dominio de unión a NBS1 en N-terminal y otro dominio de unión a RAD50 en C-terminal, así como un dominio de dimerización MRE11-MRE11 también en el extremo C-terminal (*Figura 1.7*) (Assenmacher y Hopfner, 2004; Chamankhan y Xiao, 1999; Desai-Mehata y col., 2001; Furuse y col., 1998; Usui y col., 1998).

MRE11 presenta actividad endonucleasa de cadena sencilla, exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ de doble cadena, así como una débil actividad de desenrollamiento del ADN (Assenmacher y Hopfner, 2004; D'Amours y Jackson, 2002; Furuse y col., 1998; Paull y Gellert, 1998; Trujillo y col., 2001; Usui y col., 1998). Esta actividad nucleasa de MRE11 es imprescindible en meiosis, donde parece que estaría implicada en la retirada de SPO11 tras la formación de la rotura. En la reparación de DSBs en células mitóticas se ha asociado con la formación de las colas $3'$ simplexas de ADN necesarias para la reparación mediante recombinación homóloga, aunque en este caso habría también otras nucleasas que intervendrían en este proceso. (Williams y col., 2007). La actividad nucleasa de

Introducción

MRE11 está regulada a través de interacciones con RAD50 y NBS1 (D'Amours y Jackson, 2002; Moncalian y col., 2004) y esta actividad es dependiente de Mn^{2+} .

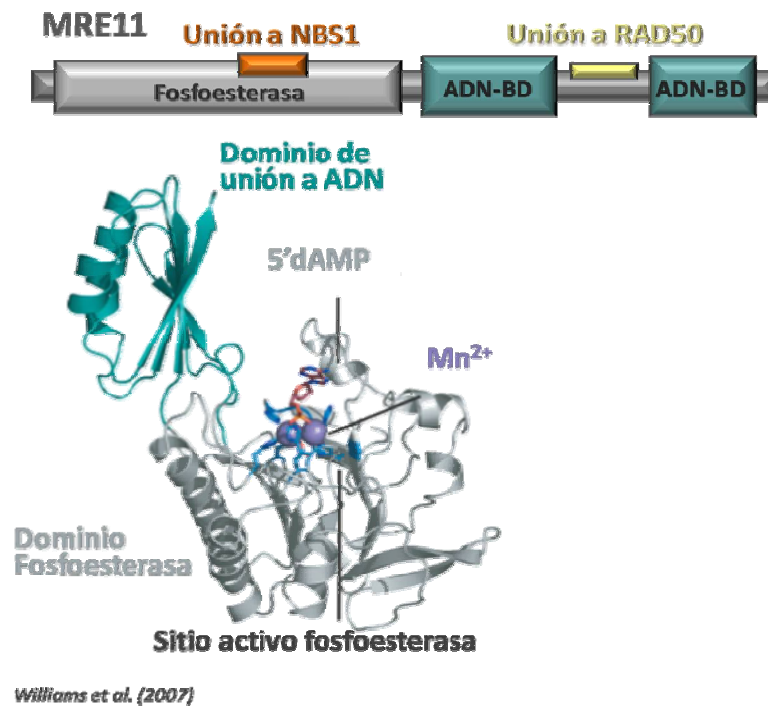


Figura 1.7 Esquema de la estructura de la proteína MRE11 de la arquea *Pyrococcus furiosus* obtenida por cristalografía de rayos X. Presenta una estructura organizada en dos dominios: el dominio fosfoesterasa en N-terminal con los motivos de coordinación de Mn^{2+} y nucleasa catalítico; y la región C-terminal que presenta un plegamiento tipo α/β , y determina la especificidad de la unión a ADN de la enzima (Williams y col., 2007).

La polaridad observada en la actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ fue en un principio sorprendente, dado que análisis genéticos y físicos de la recombinación meiótica y de la reparación de DSBs en mitosis habían sugerido que el complejo MRN estaba involucrado en la actividad exonucleolítica $5' \rightarrow 3'$. Así, los datos estructurales y bioquímicos sugieren que la generación de las colas $3'$ en los procesos de recombinación requiere la presencia del complejo MRN, pero también la intervención de otras moléculas, entre las cuales estaría la exonucleasa *ExoI*, y al menos otra nucleasa hasta ahora no identificada (Borde, 2007; Shrivastav y col., 2008).

Estructura y propiedades de Rad50

El gen *Rad50* tiene homología en su secuencia con los genes de la familia SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*), y la proteína que codifica comparte con esta familia prácticamente la misma estructura de sus dominios.

La proteína RAD50 contiene un dominio bipartito ATPasa tipo ABC (*ATP Binding Cassette*), que comprende un segmento N-terminal (N-ATPasa) y un segmento C-terminal (C-ATPasa), con los dominios Walker A y Walker B, respectivamente, así como un motivo denominado *signature*, formado por la secuencia conservada LSGG, característica de las proteínas SMC. Los dominios Walker A y Walker B están a ambos lados de dos segmentos de siete repeticiones, que dan lugar a la región que se conoce como la cola de la proteína. Estos segmentos de la cola son antiparalelos, y se pliegan uno sobre el otro adquiriendo una conformación de hélice- γ , situando juntos los motivos Walker A y Walker B para formar el dominio de unión a ATP, el cual es considerado la cabeza de la proteína. Adyacente a los segmentos Walker A y Walker B están los sitios de unión a MRE11. El centro de las repeticiones de la región de la cola contiene un motivo altamente conservado Cys-X-X-Cys (CXXC), que forma dominios de interacción entre moléculas de RAD50, mediante la coordinación de metales, generalmente zinc, y que se denomina *zinc-hook* (Figura 1.8) (Hopfner y col., 2000, 2001, 2002; Wiltzius y col., 2005; Williams y col., 2007).

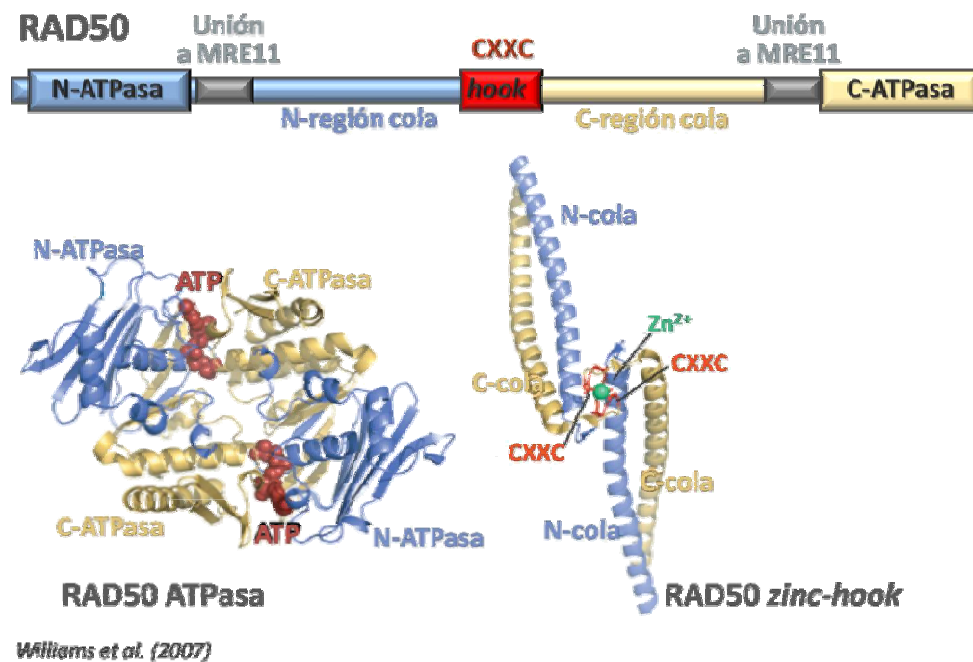
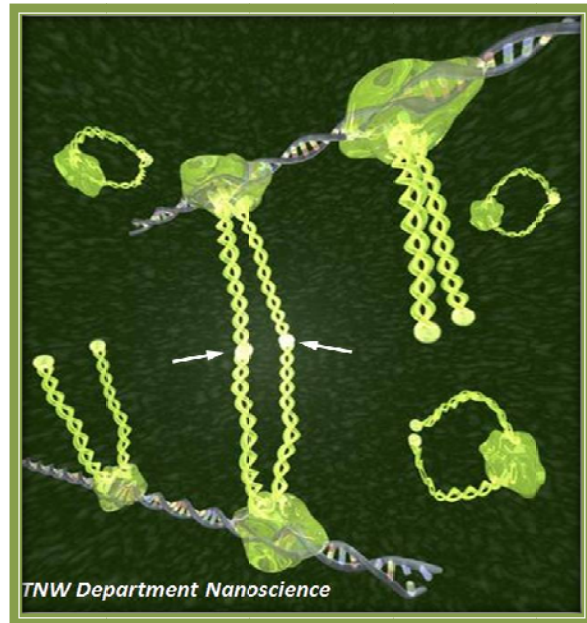


Figura 1.8 Esquema de la estructura de RAD50 de la arquea *P. furiosus* obtenida mediante cristalografía de rayos X. Se muestra la estructura terciaria que adopta el dominio ATPasa (inferior izquierda). La interacción intermolecular de RAD50 (inferior derecha) es a través de la coordinación de un ión Zn^{2+} por las cuatro cisteínas conservadas (dos cisteínas de cada motivo CXXC).

Introducción

Varios modelos actuales sugieren que la región de la cabeza que contiene la función ATPasa es responsable de la interacción directa con sustratos de ADN, mientras que los motivos CXXC de RAD50 actúan en la unión entre moléculas de RAD50 pertenecientes bien al mismo complejo MRN o a diferentes complejos, de forma que en el último caso se forman grandes andamios que conectan los extremos de ADN durante los procesos de recombinación (*Figura 1.9*) (Hopfner y col., 2002; Moreno-Herrero y col., 2005; Williams y Tainer, 2005).

Figura 1.9 Dibujo esquemático de complejos MRN formado los “andamios” de conexión entre moléculas de ADN. La región globular unida al ADN comprende el dominio catalítico de dos moléculas de RAD50 junto con dos moléculas de MRE11, y dos complejos pueden interaccionar entre sí a través del dominio zinc-hook (flechas) manteniendo así próximos los extremos de la rotura.



Estructura y propiedades de Nbs1

Mientras que los genes *Mre11* y *Rad50* están altamente conservados en bacterias, arqueas y eucariotas, el tercer miembro del complejo, *Nbs1* (*Xrs2* en levaduras), está menos conservado entre las especies, y sólo se han encontrado ortólogos en eucariotas.

NBS1 contiene un dominio FHA/BRCT (*ForkHead Associated/Breast Cancer C-Terminus*) en su extremo N-terminal, dominios de unión a MRE11 y ATM en la región C-terminal, y además se han encontrado puntos para la fosforilación por la kinasa ATM de ciclo celular. El dominio de unión a MRE11 consiste en sólo 10 aminoácidos y está muy conservado desde levaduras hasta humanos, de forma que sirve como marcador eficiente para la identificación de ortólogos de *Nbs1* en muchos organismos (Akutsu y col., 2007). Mediante análisis de secuencia se han identificado motivos conservados Ser-Gln (SQ), identificados en mamíferos como una diana consenso para la fosforilación por ATM,

estando presente en numerosas proteínas implicadas en la reparación del ADN y en señalización intracelular del daño en el ADN (*Figura 1.10*) (Desai-Mehta y col., 2001; Kobayashi y col., 2002, 2004; Paull y Gellert, 1999; Tauchi y col., 2001).

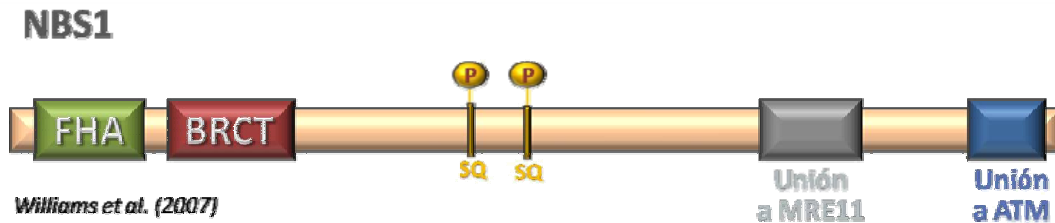


Figura 1.10 Actualmente la información que existe sobre la estructura de Nbs1 es muy reducida. Los análisis de secuencia indican que el extremo N-terminal contiene dominios FHA y BRCT de interacción con fosfopéptidos. Los dominios de interacción con MRE11 y ATM se sitúan en C-terminal. En la región central de la proteína se han encontrado motivos SQ, susceptibles de ser fosforilados por la kinasa de ciclo celular ATM.

La proteína NBS1 participa en interacciones proteína-proteína, y regula las actividades enzimáticas de los otros dos miembros del complejo, no habiéndose descrito ninguna actividad enzimática asociada a ella. NBS1 está implicada en la conexión entre la detección del daño en el ADN y los eventos de señalización, a través de la kinasa ATM. Además, por medio del dominio FHA/BRCT, NBS1 se une directamente a γ -H2AX, la forma fosforilada por ATM de la histona H2AX y, aunque este proceso no se conoce con precisión, se ha sugerido que esta interacción podría ser responsable de la localización y acumulación del complejo MRN en estas zonas (Kobayashi, 2004; Tauchi y col., 2002).

1.3.2. FUNCIONES DEL COMPLEJO MRN

El complejo MRN está implicado en la reparación de DSBs a través de las vías tanto de recombinación homóloga como de recombinación ilegítima. En ambos casos tendría por un lado un papel estructural a la hora de mantener la conexión entre los extremos de ADN en el caso de la reparación vía NHEJ, así como las regiones de homología (por ejemplo, las cromátidas hermanas) en la reparación mediante recombinación homóloga. Además de este papel arquitectónico, el complejo MRN también está implicado en el procesamiento de los extremos, de forma que en las vías de recombinación homóloga participaría en la formación de las colas simplexas 3' para la posterior invasión del dúplex

Introducción

homólogo, aunque en este proceso intervendrían también otras nucleasas; y en el caso de la reparación mediante NHEJ, el complejo MRN va a estimular la unión de los extremos de la rotura a través del complejo de la ADN ligasa IV (D'Amours y Jackson, 2002).

Se ha visto que MRE11 se une formando un dímero que interacciona a su vez con los dominios catalíticos ATPasa de RAD50, dando lugar a un heterotetrámero $MRE11_2RAD50_2$ (Figura 1.11) conocido como complejo M_2R_2 (Hopfner y col., 2001). De este modo se sitúan próximas las regiones de actividad nucleasa de MRE11 y de unión a ADN, con la actividad ATPasa de RAD50, formando un dominio globular, del cual salen como protuberancias las dos regiones de la cola de RAD50. Tanto la unión a ADN del complejo M_2R_2 , como la actividad nucleasa de MRE11 son dependientes de ATP. De esta forma, cuando el complejo no está unido a ADN, las dos colas protuberantes de RAD50 pueden interaccionar entre sí a través de los dominios *hook*, adquiriéndose una conformación intra-molecular (Figura 1.12). Tras la unión de este complejo a ADN a través de la cabeza globular, se produciría un cambio conformacional que altera la orientación de las colas de RAD50, favoreciendo su conformación inter-molecular, de manera que las colas ya no interaccionan entre sí, sino que lo hacen con otras colas pertenecientes a otro complejo, de manera que se formarían complejos octaméricos, lo que permite el acercamiento de extremos de ADN (Figura 1.13) (de Jager y col., 2001; Moreno-Herrero y col., 2005). Son los dominios *zinc-hook* los que median la interacción entre moléculas de RAD50, y esta unión *hook-hook* de RAD50 facilita la construcción de un gran andamio de unión entre el ADN durante los procesos de recombinación (Wiltzius y col., 2005).

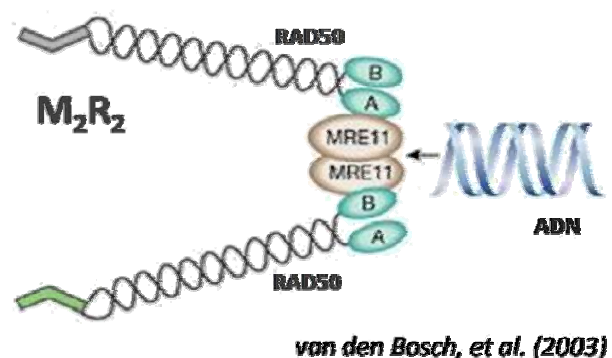


Figura 1.11. Esquema de un heterotetrámero M_2R_2 , donde dos monómeros RAD50 interaccionan a través de su región globular con un homodímero de MRE11.

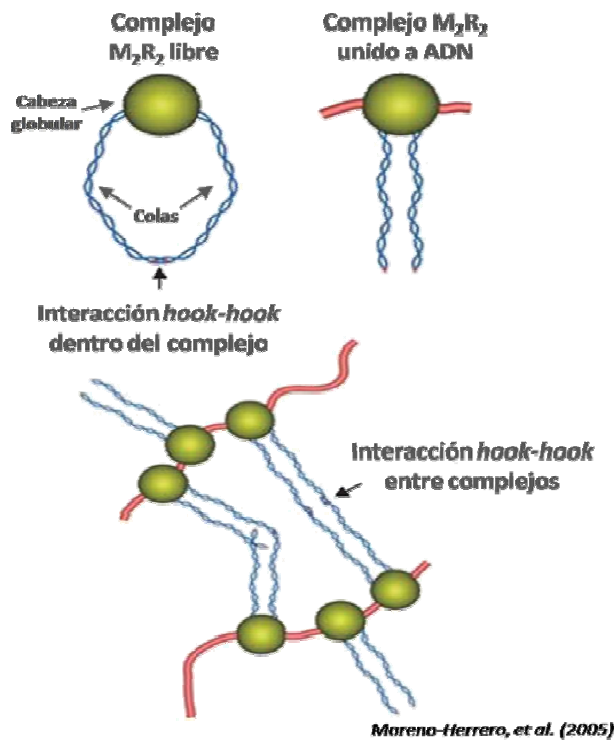
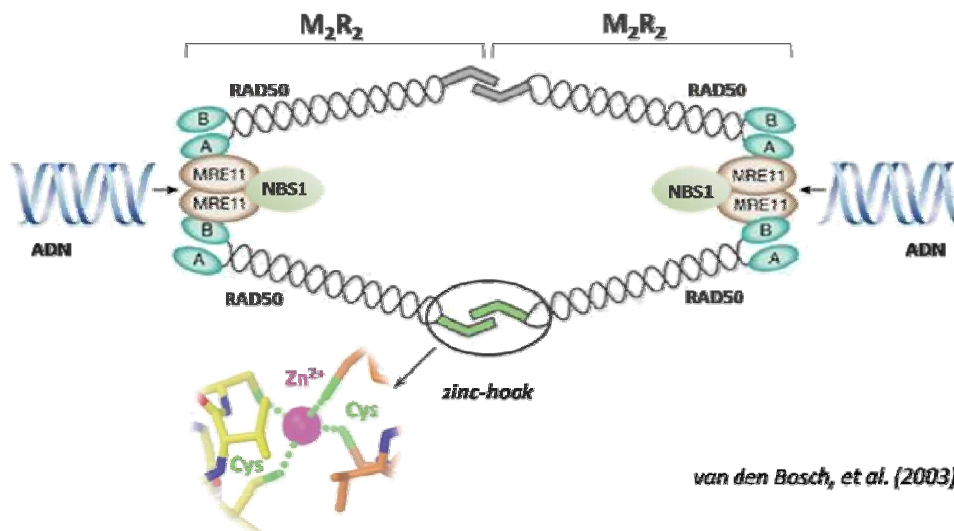


Figura 1.12 Cambios conformacionales del complejo M_2R_2 tras la interacción con ADN a través de su dominio globular. Esto permite la interacción entre diferentes complejos, fundamental para las funciones de conexión del ADN.

Figura 1.13 Esquema de la organización del complejo MRN en la unión entre extremos de ADN. La localización de NBS1 dentro del complejo aún no se ha determinado con precisión. Se muestra la interacción entre dos complejos MRN a través de los dominios zinc-hook de RAD50 por coordinación de un ión Zn^{2+} con las cuatro cisteínas (dos de cada motivo CXXC).



El complejo MRN también es necesario en el proceso de recombinación meiótica, y se encarga de retirar la proteína SPO11 unida covalentemente al extremo 5' del ADN mediante su actividad nucleasa. El papel de este complejo en meiosis está bien estudiado en *S. cerevisiae* (Borde, 2007; Johzuka y Ogawa, 1995) y *Arabidopsis* (Puizina y col., 2004), donde se ha visto que la supresión de los miembros del complejo conduce a la aparición de puentes anafásicos, fragmentación de cromosomas, y una reducida viabilidad de las esporas o baja producción de semillas. Además, RAD50 tendría un papel estructural manteniendo unidas las cromátidas hermanas para establecer la arquitectura

apropiada previa a la rotura, formando un complejo pre-DSB (Borde, 2007; Wiltzius y col., 2005).

El complejo MRN actúa además como un sensor primario en la detección del daño en el ADN. Se ha localizado este complejo mediante inmunofluorescencia, y se ha detectado que las proteínas MRE11 y RAD50, en condiciones normales, se encuentran uniformemente distribuidas por todo el núcleo, pero tras la exposición a radiación ionizante, ambas proteínas forman *foci* discretos en el núcleo, que marcan la posición de las DSBs (Symington, 2002).

Se tiene un menor conocimiento del papel del complejo MRN en la activación de puntos de control por daños en el ADN. Se ha visto que es necesario para mediar los puntos de control en la fase S tras la DSB, promoviendo una respuesta a través de la kinasa ATM. Los mecanismos por los que actúa no están del todo claros, y parece ser que el complejo MRN actuaría tanto aguas arriba como aguas abajo de la kinasa ATM. La activación de ATM inicia una cascada de señalización que lleva a la parada del ciclo celular, la reparación del ADN y/o apoptosis.

ATM está presente como un dímero inactivo en las células ilesas y, en respuesta a DSB, sufre una activación de la kinasa, se produce la disociación del dímero y como consecuencia tiene lugar una rápida autofosforilación. MRN parece ser un sensor primario en el proceso de la activación de ATM, y NBS1 actuaría como un adaptador y regulador en este proceso, reclutando ATM a las zonas de lesiones en el ADN (Lavin, 2007; Lee y Paull, 2004, 2007; Olson y col., 2007; Uziel y col., 2003; Williams y col., 2007; You y col., 2005). Una vez activada, ATM fosforila una serie de proteínas diana en residuos de serina adyacentes a glutamina (SQ), para la regulación de la respuesta celular de los puntos de control y la reparación del ADN dañado, entre ellas NBS1, la histona H2AX y la propia ATM. La histona fosforilada γ -H2AX interacciona a su vez con la proteína NBS1 a través de su dominio FHA/BRCT. Esta histona modificada se extiende en torno al sitio de la rotura cubriendo varias kilobases en el caso de levaduras y megabases en eucariotas superiores, marcando el sitio de la DSB en el ADN, y proporciona una plataforma de reclutamiento regulado por fosforilación para el ensamblaje de otros factores (*Figura 1.14*).

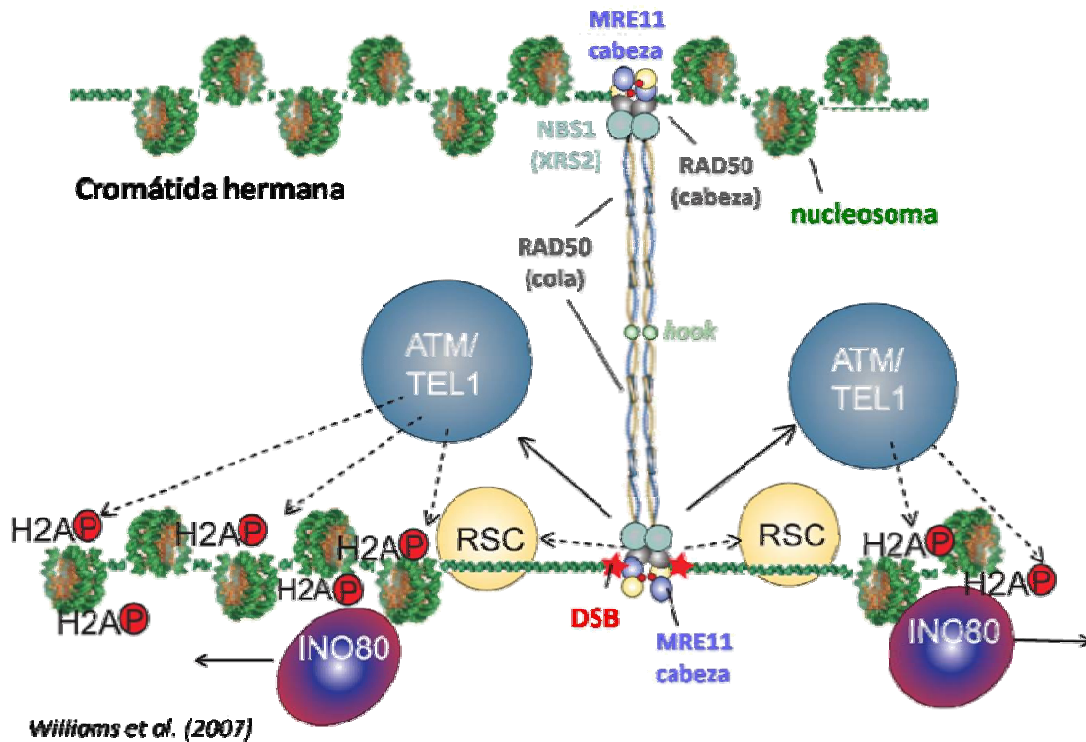


Figura 1.14 El complejo MRN es necesario para la modificación covalente y el remodelado de la cromatina en las DSBs. Este esquema representa como tendría lugar la remodelación de la cromatina en la levadura tras la formación de la DSB. Tras la inducción de DSB, MRN (MRX en levaduras) se une a los extremos rotos del ADN y facilita el reclutamiento y activación de ATM (Tel1 en levaduras), la cual fosforila entonces la histona nucleosomal H2AX y ésta se expande cubriendo un gran dominio de cromatina. El complejo INO80 se une directamente a γ -H2AX para mediar la retirada de esta histona, un proceso dependiente de MRN que permite la reparación del ADN. El remodelador de la cromatina RSC también se localiza en las zonas de DSB, presumiblemente a través de interacciones con MRN, donde puede mediar cambios en la estructura de la cromatina que potencian la señalización de puntos de control dependiente de MRN y la reparación del ADN.

En cuanto a la función de MRN en los telómeros, este complejo tiene un papel importante en la creación de un sustrato adecuado para la telomerasa y proteínas asociadas creando extremos simplejos 3'. También participa en la activación de ATM, la cual, a través de su actividad kinasa, potencia indirectamente el reclutamiento de la telomerasa hacia telómeros cortos. RAD50 tendría un papel estructural con función conectora para mantener la unión entre cromátidas hermanas necesaria para la extensión de los telómeros dependiente de telomerasa (Wiltzius y col., 2005). En ausencia de RAD50 en *Arabidopsis* se ha visto un rápido acortamiento de los telómeros y fusión de extremos cromosómicos (Gallego y White, 2000; Vannier y col., 2006).

1.4. IMPORTANCIA DE LOS CEREALES: TRIGO Y CEBADA

Desde el comienzo de la agricultura hace 10.000 años, los cereales han supuesto la principal fuente de calorías en la alimentación humana. Reconocidos por su alta productividad, valor nutricional, y la facilidad en su almacén y transporte, distintos tipos de cereales han sido cultivados por agricultores de todo el mundo. Entre ellos, el trigo y la cebada, miembros de la tribu Triticeae (familia *Poaceae*), han sido particularmente importantes, suponiendo casi una tercera parte de la producción global de cereales.

La cebada ocupa el cuarto lugar en importancia entre los cereales, después del trigo, maíz y arroz, produciéndose en España cerca de siete millones de toneladas anuales. La razón de su importancia se debe a su amplia adaptación ecológica y a la diversidad de aplicaciones. La cebada cultivada (*Hordeum vulgare*) desciende de la cebada silvestre (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*), siendo éstas diploides ($2n=2x=14$; HH).

El trigo fue domesticado hace unos 10.000 años, y desde entonces, su cultivo se ha extendido por todo el mundo, convirtiéndose en una de las principales especies cultivadas. Con 620 millones de toneladas producidas anualmente, el trigo proporciona hasta una quinta parte de las calorías totales consumidas por el hombre. En torno al 95% de los cultivos de trigo son del trigo común, *Triticum aestivum*, también conocido como trigo panadero o trigo blando. El restante 5% corresponde al cultivo de trigo duro, *Triticum turgidum*, empleado fundamentalmente en la elaboración de pasta (Dukovsky y col., 2007).

Durante la evolución del trigo se han producido varios pasos de poliploidización entre especies de los géneros *Triticum* y *Aegilops* (tribu Triticeae, subfamilia Pooideae). El trigo común es un alohexaploide formado por la confluencia de los genomas de tres especies diploides ($2n=6x=42$, AABBDD). Los análisis citogenéticos, así como estudios moleculares más recientes, han proporcionado información para identificar a las especies donantes de los diferentes genomas, y las relaciones filogenéticas de evolución del grupo de especies en los que están incluidos los géneros *Triticum* y *Aegilops*.

Los trigos silvestres y cultivados incluyen especies diploides, tetraploides y hexaploides. En los trigos poliploides se han detectado dos líneas de evolución, situándose las especies *Triticum turgidum* (AABB) y *Triticum aestivum* (AABBDD)

dentro de la misma línea evolutiva (Huang y col., 2002). Los primeros estudios citogenéticos parecían indicar que el genoma A fue aportado por *Triticum monococcum* ($2n=2x=14$, AA). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que el verdadero donador del genoma A en ambas líneas de evolución ha sido *Triticum urartu* ($2n=2x=14$, AA) (Dvorak y col., 1993). También se ha sugerido que el trigo silvestre *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* ($2n=4x=28$, AABB) provendría de la hibridación entre *T. urartu* y otro trigo silvestre diploide que aportaría el genoma B. Tras el cultivo de miles de años, aparecería el alohexaploide *T. aestivum*, por hibridación espontánea entre *T. turgidum* ssp. *dicoccum* y el diploide *Aegilops tauschii* ssp. *strangulata* ($2n=2x=14$, DD), siendo por tanto este último el donador del genoma D (Figura 1.15) (Chantret y col., 2005; Feldman y Levy, 2005; Huang y col., 2002; Petersen y col., 2006).

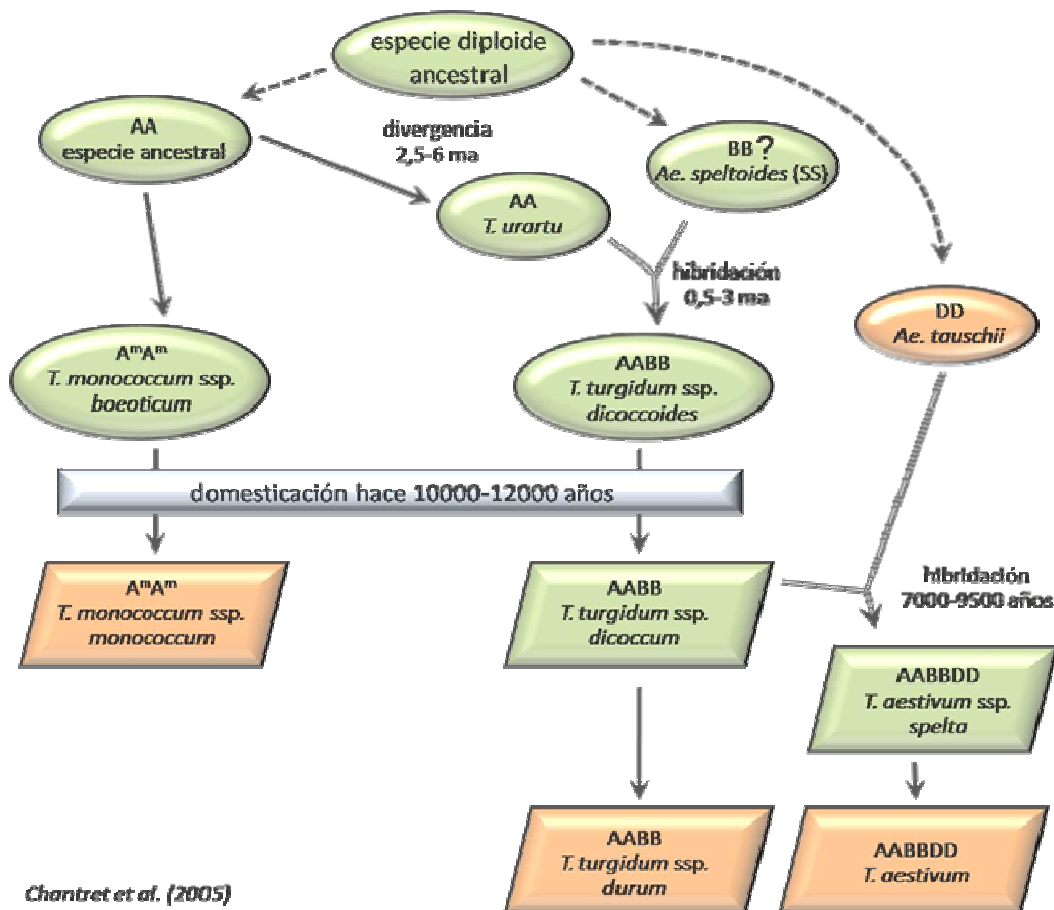


Figura 1.15 Esquema sobre los procesos de poliploidización que dieron origen al trigo común *T. aestivum*. Las especies silvestres y cultivadas se representan en círculos y cuadrados, respectivamente. Las especies empleadas en este trabajo aparecen en naranja. Se indica una fecha aproximada para los procesos de divergencia e hibridación (ma=millones de años).

En cuanto al genoma B, y a pesar de las décadas de estudio sobre el tema, sigue habiendo controversia sobre su origen. Muchas evidencias sugieren al ancestro *Aegilops speltoides* ($2n=2x=14$, SS) como donador del que se convertiría en el genoma B de los trigos duro y panadero (Huang y col., 2002). De cualquier forma, no hay ningún genoma B entre los trigos diploides actuales que se corresponda exactamente con el de los alopoliploides por lo que se ha de suponer que en todo caso el donante desapareció, y los *Ae. speltoides* actuales son los derivados más próximos.

El complemento cromosómico haploide del trigo hexaploide *Triticum aestivum*, consta por tanto de tres genomas denominados A, B y D, de forma que cada uno incluye un juego básico de siete cromosomas. Éstos son metacéntricos o submetacéntricos. Así, los 21 cromosomas del juego haploide se clasifican en siete grupos de homología, de tres cromosomas cada grupo pertenecientes cada uno a un genoma distinto. Los tres cromosomas derivan del mismo cromosoma de un genoma ancestral, y por eso se dice que son cromosomas homeólogos.

1.4.1. DESTINO DE LOS GENES DUPLICADOS

Cuando los genes se duplican como consecuencia de un fenómeno de poliploidización pueden continuar evolucionando del mismo modo que en los ancestros diploides, o pueden ser objeto de presiones que los lleven a diferentes grados en la de diferenciación en la secuencia de evolución. Es conocido, por ejemplo, en el caso de trigos tetraploides y hexaploides, que el genoma B muestra más diversidad que los otros dos genomas. La explicación para la acumulación diferencial de diversidad entre los genomas A y B de trigos tetraploides no se conoce, pero puede reflejar la acción de fenómenos de introgresión interespecífica y selección diferencial, o de mecanismos internos como transposición, metilación diferencial, mutación o recombinación (Wendel, 2000).

En la evolución es frecuente que tras la duplicación de los genes se mantenga la función de las copias. Esto puede ocurrir en casos donde se favorezca un incremento en los niveles de síntesis de los transcritos, o también cuando la redundancia génica pueda crear ventajas como, por ejemplo, en particulares estados del ciclo de desarrollo o bajo determinadas condiciones ambientales. El hecho de que persistan genes duplicados no

implica necesariamente que retengan idéntica función o expresión; se pueden dar casos de diversificación funcional adquiriendo alguna de las copias nuevas funciones.

La selección también puede operar modulando la expresión entre las dos copias del gen. Se puede dar un silenciamiento génico, llevando a la pérdida de la expresión de alguno de los genes duplicados. En trigos tetraploides y hexaploides, se ha observado una diploidización de las proteínas del endospermo. Se ha visto en líneas hexaploides, una variabilidad en la expresión de gluteninas de alto peso molecular, observándose un silenciamiento en los homeólogos del genoma A en unos casos (Feldman y col., 1986), y del B en otros (Kawaura y col., 2005). Se ha propuesto este fenómeno como una selección para la eficiente producción de los apropiados niveles de proteínas de reserva. También en genes ribosomales duplicados como resultado de la poliploidización en Triticeae, se ha visto que regiones repetitivas en tándem de ADN ribosomal 25S-5.8S-18S no sólo se han silenciado tras la poliploidización, sino que se han perdido completamente (Wendel, 2000).

En cualquier caso, el análisis de la actividad comparada de los genes duplicados en las especies poliploides es difícil de abordar de forma directa. Para ello, sería preciso contar con métodos que permitiesen aislar y cuantificar los productos directos de la expresión de los genes, es decir de los ARNm transcritos directos, producidos por cada gen. En el caso del trigo se han hecho algunas aproximaciones citogenéticas con anterioridad. De este modo, el primer intento de abordar el estudio consistió en el análisis de la conformación de la cromatina en el momento de la expresión, tratando de relacionar las características físicas de la cromatina observables al microscopio, con la expresión de los genes, tras ciertos tratamientos. Para llevar a cabo este estudio era requisito indispensable una metodología citogenética lo suficientemente resolutive como para identificar los cromosomas y las regiones en que se encuentran los genes cuya expresión se deseaba analizar. En el caso de contar con este tipo de metodología, lo siguiente es la observación del estado descondensado, o la propia visualización de la transcripción, o ya de forma indirecta, de proteínas implicadas en la expresión de los genes.

En los años ochenta, con el desarrollo de las técnicas de tinción con plata, Ag-NOR, se hizo una aproximación al estudio de la actividad de los genes de ADN ribosomal en especies poliploides e híbridos de cereales. Los ARN ribosomales (ARNr) son fundamentalmente los componentes de la maquinaria de síntesis de las proteínas. En los

eucariotas existen dos familias génicas independientes que codifican para dos tipos de ARN ribosomal: 25S-5.8S-18S, y 5S. La familia de 25S-5.8S-18S se encuentra organizada como repeticiones en tándem, en las regiones de organización nucleolar (NORs). Los estudios de hibridación *in situ* en *Triticum aestivum*, permitieron localizar el sistema multigénico ADN_r 25S-5.8S-18S en los NOR de los cromosomas 1B y 6B (mayores) y en los cromosomas 1A, 5D y 7D (menores) (Mukai y col., 1991). Se trata de largas regiones en las que se encuentra un número elevado de genes ribosomales repetidos en tándem, que varía desde 5.000 a 18.000 (Appels y Honeycutt, 1986).

La actividad de los genes ARN_r en los cereales se abordó utilizando la tinción de plata por observación citológica durante la formación de los nucleolos (Cermeño y col., 1984; Lacadena y col., 1988; Moreno y col., 1990). El estudio se refería a la intensidad de la tinción en los loci de los cromosomas satelizados, que son los lugares de actividad NOR. Bajo las condiciones de experimentación, la tinción Ag-NOR revelaba la presencia de unas proteínas no histónicas, que a su vez se asociaron a la transcripción de los loci ADN_r funcionales en la interfase previa, lo que se traducía en la presencia de unos precipitados de plata en los cromosomas mitóticos (Schwarzacher y col., 1978).

De este modo, la reacción Ag-NOR se consideraba un indicador de la actividad génica, y el estudio comparado de los genes homeólogos de los diferentes genomas en los trigos alopoloides y en híbridos, permitió sugerir la existencia de mecanismos de "competición nucleolar" y deducir la existencia de diferencias en el potencial de actividad de las regiones génicas de los loci ADN_r duplicados. Este tipo de análisis alimentó la teoría de la "anfiplastia", un término que había sido acuñado por Navashin en 1928, para definir los cambios morfológicos que ocurren en los cromosomas, debido a fenómenos de modificaciones de la expresión de los genes.

Sin embargo, el análisis de la competición de las regiones homeólogas de ADN_r, realizado con tinción Ag-NOR, adolecía de cierta indefinición, dado que no se llevaba a cabo una observación de los productos de expresión (ARN_r), sino de unas proteínas que se observaban en cromosomas mitóticos condensados, que se suponían asociadas a los loci que habían sido expresados en la interfase anterior (Cermeño y col., 1984a, 1984b; Lacadena, 1988).

La insuficiencia de las técnicas de tinción con plata para analizar problemas de competición entre loci homeólogos, y concretamente los relativos a las regiones de

actividad nucleolar, se puso de manifiesto con el desarrollo de las técnicas de observación directa de estas regiones mediante hibridación "in situ". De este modo, cuando se pudo analizar de forma directa el grado de dispersión de los ADNr en núcleos interfásicos, e incluso visualizar la transcripción en base a la expansión de las fibras de cromatina alrededor de los loci ADNr, se puso de manifiesto una falta de correlación entre las zonas de tinción con plata y la expresión de los citados loci (Sommerville, 1985; Appels y Honeycut, 1986; Cuadrado, 1994). De hecho, la hibridación "in situ" con fluorescencia, permitió no sólo detectar la expresión de los loci de ADNr en interfase, sino determinar su actividad, incluso en casos en que mediante la tinción con plata se había supuesto inactividad (Cuadrado, 1994). De cualquier modo, la evolución de las técnicas citogenéticas, permitió avanzar en el aspecto cualitativo de la actividad comparada de los genes duplicados, aunque faltaba por determinar el nivel cuantitativo de expresión de los loci homeólogos en que se visualizaba actividad transcripcional. Por otra parte, este tipo de estudios estaba circunscrito a loci repetitivos, que son a los que por falta de resolución de secuencias simples y más cortas se puede llegar con las técnicas de FISH.

La siguiente aproximación es la de la determinación directa del nivel de expresión de los distintos genes duplicados homeólogos presentes en las especies aloploides, mediante una cuantificación de los transcritos producidos. Para poder llevar a cabo estos estudios es necesario contar con una metodología eficiente que permita aislar los transcritos de ARNm a partir de los tejidos en que se están expresando los genes, y poder diferenciar los productos de expresión de cada gen homeólogo para cuantificar el nivel relativo de la expresión de cada uno de ellos. Una técnica que permite abordar el estudio de la expresión de estos genes homeólogos es la técnica de SSCP, mediante la cual se pueden resolver moléculas de ADN de idéntico tamaño que presenten alguna diferencia en su secuencia.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se aborda el estudio de los procesos de recombinación homóloga en plantas de elevado interés agronómico como son los cereales, y particularmente el trigo y la cebada. Con este propósito, se analizan aspectos diferentes de la recombinación, quedando divididos los objetivos en dos grandes bloques:

- Profundizar en el conocimiento de los mecanismos que controlan los procesos de recombinación homóloga en cereales.
 - Poner a punto las técnicas de transformación mediante agroinfección para trasladar a cereales un sistema desarrollado en plantas modelo para el estudio de frecuencias de recombinación homóloga.
- Caracterizar el complejo MRN, un sistema genético implicado en los procesos de recombinación. Ello implica las siguientes aproximaciones:
 - La caracterización molecular de los genes *Mre11*, *Rad50*, *Nbs1* (complejo MRN) para los distintos genomas de trigo, obteniendo las secuencias génicas y de ADN copia, determinando el número de copias en los genomas, y determinando su localización cromosómica.
 - El análisis de la expresión de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*, mediante dos aproximaciones: un estudio de la expresión global de cada gen en cada una de las especies, y un análisis de la expresión relativa de los genes homeólogos en el caso de las especies poliploides. Esto supone a su vez el desarrollo de una técnica eficiente que permita llevar a cabo el segundo tipo de análisis mediante la modificación de la técnica original de SSCP.
 - Hacer ensayos de interacción entre las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 mediante el sistema de doble híbrido, para a su vez determinar si se produce o no interacción entre proteínas procedentes de la expresión de genes homeólogos de distintos genomas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Material Vegetal

En este trabajo se han utilizado diferentes especies de trigo para la caracterización de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*, componentes del complejo MRN. Se han empleado las especies diploides *Triticum monococcum* ($2n=2x=14$; genoma AA) y *Aegilops tauschii* (Coss.) Schmal. (= *Aegilops squarrosa* L.) ($2n=2x=14$; genoma DD), la especie tetraploide *Triticum turgidum* variedad ‘Vitron’ ($2n=4x=28$; genomas AABB), y la especie hexaploide *Triticum aestivum* cultivar ‘Chinease Spring’ ($2n=6x=42$; genomas AABBDD).

También se emplearon dos líneas nulitetrasómicas de la variedad de trigo ‘Chinese Spring’, concretamente las líneas N5AT5B y N5DT5A.

En cuanto al trabajo realizado para profundizar en el estudio de los mecanismos de recombinación homóloga se utilizó la variedad ‘Golden Promise’ de cebada (*Hordeum vulgare* L.), así como las variedades de trigo ‘Bobwhite’ y ‘Florida’.

Estirpes Bacterianas y de Levaduras

Para la clonación de fragmentos de ADN se ha utilizado la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Para la transformación de embriones inmaduros de trigo y cebada se ha usado la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

En los ensayos de doble híbrido se empleó la cepa EGY48[p8op-lacZ] de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El aislamiento del ADN genómico se llevó a cabo a partir de hojas jóvenes siguiendo el método descrito por Sharp y col. (1988). El protocolo de extracción se detalla en el *Anexo I.1. Aislamiento de ADN*.

El ARN total se extrajo a partir de espigas inmaduras en etapa de meiosis, utilizando el kit *Tripure Isolation Reagent* (Roche), siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial. El estado de meiosis de las espigas recogidas se confirmó mediante la observación microscópica de preparaciones de este material. Para eliminar el posible ADN contaminante, se trataron las muestras de ARN con el kit *Turbo DNA-free* (Ambion) de acuerdo a lo indicado en el protocolo suministrado por la firma comercial.

La integridad del ADN y ARN obtenido fue examinada en geles de agarosa siguiendo técnicas estándar de biología molecular (*Anexo I.2. Electroforesis de ácidos nucleicos*). La concentración de las distintas muestras de ácidos nucleicos fue determinada mediante espectrofotometría.

La síntesis del ADN copia a partir del ARN total se realizó empleando el kit *Transcriptor first strand cDNA synthesis* (Roche), usando como cebador el *anchored-oligo (dT)₁₈ primer* de acuerdo con las recomendaciones descritas por la casa comercial.

Para la obtención de ADN plasmídico a pequeña escala se utilizó el kit *High pure plasmid isolation* (Roche), según las recomendaciones de la casa comercial con algunas modificaciones. Así, el lavado con el tampón *wash buffer II* se llevó a cabo durante 5 minutos antes de la centrifugación, y en el paso final de elución se añadió el tampón *elution buffer* caliente a 65°C, dejando la columna durante 1 minuto antes de centrifugar.

3.3. AMPLIFICACIONES POR PCR

Para la amplificación de las secuencias genómicas y de ADN copia de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1* se llevaron a cabo las reacciones de PCR en un volumen de 50 µl usando como molde 100 ng de ADN genómico o 2 µl de ADN copia. Se emplearon distintas polimerasas de alta fidelidad de copia como *LA Taq* (Takara) o *PfuUltraII fusion HS* (Stratagene), las cuales añaden un nucleótido dATP adicional en los extremos 3'. En otros casos se empleó la enzima *Fast Start high fidelity PCR system* (Roche) que al amplificar deja extremos romos. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las recomendadas por las casas suministradoras de las diferentes enzimas utilizadas. Los productos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 1% siguiendo técnicas estándar. Para su visualización se procedió a su tinción con bromuro de etidio.

Una vez amplificados, los productos fueron purificados utilizando el kit *High pure PCR product purification* (Roche) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Posteriormente, los productos fueron clonados (*Anexo I.4. Clonación de fragmentos de ADN*) y secuenciados (*Servicio de secuenciación Unidad de Biología Molecular, UAH*).

La amplificación de los extremos de los ADN copia se llevó a cabo empleando el kit *5'/3' RACE Kit, 2nd generation* (Roche), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Estos productos fueron también clonados y secuenciados de la misma manera que en el caso anterior.

3.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para la obtención de las secuencias genómicas y de ADN copia de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1* en las distintas especies de trigo se utilizó la información disponible sobre estos genes en las bases de datos de otras especies de plantas superiores, como el arroz (*Oryza sativa* L.) o *Arabidopsis thaliana*, así como secuencias de ESTs (*Expressed Sequences Tag*) del propio trigo (*Triticum aestivum* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), centeno (*Secale cereale* L.) y maíz (*Zea mays* L.). Una vez recopilada esta información se localizaron las regiones más conservadas y sobre éstas se diseñaron oligonucleótidos para ser utilizados en las reacciones de PCR.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se recogen en las tablas incluidas en el *Anexo II – Oligonucleótidos*, clasificados según la finalidad de su uso. En este mismo anexo se incluyen tres esquemas donde se indica la posición de los cebadores diseñados para el estudio de los genes.

3.5. TRANSFORMACIÓN DE TRIGO MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Con el fin de obtener el material de trabajo para el estudio de los mecanismos de recombinación homóloga en cereales se llevó a cabo la obtención de formas transgénicas de trigo. La transformación se realizó mediante la infección de embriones inmaduros de las variedades ‘Chinese Spring’, ‘Florida’ y ‘Bobwhite’ con *Agrobacterium tumefaciens*.

Para ello se siguió el protocolo descrito por Cheng y col. (1997), con algunas modificaciones basadas en el trabajo posterior de Wu y col. (2003).

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium* AGL1 transformada previamente con las construcciones de interés (Tabla 3.1). El crecimiento de las bacterias así como la preparación del preinóculo se realizó según se describe en el trabajo de Wu y col. (2003). El protocolo seguido a partir de este punto fue el de Cheng y col. (1997). La selección del material transformado tuvo lugar a partir de la transferencia de los callos a medio de regeneración MMSO.2C con los agentes de selección (Tabla 3.1). Tras la regeneración de las plántulas se comprobó el carácter transgénico de las mismas mediante ensayos de PCR y Southern Blot. Todo el protocolo de transformación se detalla en el Anexo I.5. *Transformación de Trigo mediada por Agrobacterium.*

Construcción	Agente selector	Concentración	Procedencia
pIU.GUS	Higromicina	25 mg/l	Orel y col., 2003
pDU.GUS	Higromicina	25 mg/l	Orel y col., 2003
pDGU.US	Fosfotricina	5 mg/l	Orel y col., 2003
pAR-ISceI	Kanamicina	35 mg/l	Orel y col., 2003

Tabla 3.1 Agentes de selección usados para las construcciones con las que se transformó el trigo y la cebada, con la concentración a la que se usaron en los medios.

3.6. TRANSFORMACIÓN DE LA VARIEDAD DE CEBADA 'GOLDEN PROMISE' MEDIADA POR *Agrobacterium*

La transformación se llevó a cabo mediante la infección de embriones inmaduros con *Agrobacterium tumefaciens*. Se siguió para ello el protocolo descrito por Tingay y col. (1997).

Se utilizó la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* transformada previamente con las construcciones utilizadas en este estudio (Tabla 3.1). A diferencia del protocolo original se suprimió el daño de los embriones mediante bombardeo con partículas de oro, previo a la inoculación, y los embriones fueron inmediatamente inoculados con el cultivo de *Agrobacterium*, dejando un período de co-cultivo de 45 minutos en oscuridad. Además se

añadió un paso final de cultivo en el medio BCI ½, para favorecer la formación de raíces antes de pasar las plántulas a tierra.

La selección de las plantas transgénicas se llevó a cabo tras sucesivos pases a los medios con los agentes de selección a partir de la etapa de inducción de callos en medio BCI. Posteriormente se comprobó el carácter transgénico de las plantas regeneradas mediante ensayos de PCR y Southern Blot. El protocolo completo se detalla en el *Anexo I.6. Transformación de Cebada mediada por Agrobacterium*.

3.7. ENSAYOS DE SOUTHERN BLOT

Para la realización de los ensayos de Southern blot se partió de 21 µg de ADN genómico en el caso de los trigos y de 15 µg para las cebadas. La digestión se llevó a cabo con la enzima de elección en cada caso, utilizándose entre 3-5 unidades de enzima por microgramo de ADN genómico a digerir.

El resultado de la digestión se cargó en un gel de agarosa 0,8% y la electroforesis se llevó a cabo durante la noche a un voltaje de 1V/cm. Al día siguiente se tiñó el gel con bromuro de etidio durante al menos 30 minutos, se eliminó el exceso de bromuro de etidio lavando el gel con agua ultra-pura (UP) durante 15 minutos, y se dejó exponiendo en un transiluminador con luz ultravioleta durante 2 minutos.

Las sondas utilizadas para la hibridación fueron marcadas con digoxigenina-dUTP (Roche) mediante PCR según se describe en el *Anexo I.7. Ensayos de Southern Blot*. Los cebadores utilizados en cada caso se registran en el *Anexo II - Oligonucleótidos*.

La hibridación y detección de las señales se realizó siguiendo técnicas estándar de biología molecular que se detallan en el *Anexo I.7. Ensayos de Southern Blot*.

3.8. ALINEACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

El análisis de las secuencias de ADN obtenidas para cada gen se realizó utilizando el programa *Sequence Navigator* (Applied Biosystem). El ADN y las secuencias deducidas de las proteínas codificadas por cada gen fueron alineadas usando el programa *Clustal*

W1.5 (Thompson y col., 1994). Para cada gen del sistema MRN analizado, se procedió a la alineación de las secuencias obtenidas en este estudio con las de otros publicados previamente de arroz, *A. thaliana*, seres humanos, *S. cerevisiae* y maíz (éste último en el caso de *Mre11* y *Nbs1*).

Con la información de las alineaciones se obtuvieron matrices de distancias y a partir de ellas se construyeron los árboles filogenéticos correspondientes usando el método de distancia de *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Versión 3.6* (Felsenstein, 2004). Para la realización de las matrices de distancia se utilizó el métodos de dos-parámetros de Kimura (1980) con el programa de *PROTDIST*. Los árboles de la distancia fueron contruidos por el método del vecino más próximo (*neighbour-joining*) de Saitou y Nei (1987).

3.9. HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (*FISH*)

Para la localización de los genes en los cromosomas se emplearon técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia. Las preparaciones cromosómicas se realizaron partiendo del meristemo radicular de semillas en germinación. Para obtener el material se siguió un procedimiento que permite sincronizar el estado de las semillas en cuanto a la fase del ciclo celular en la que se encuentran. Para ello se colocaron las semillas en placas Petri sobre papel humedecido durante 24 horas en oscuridad a 25°C y posteriormente se dejaron 2-3 días a 4°C. Pasado este tiempo se transfirieron a 25°C para estimular la actividad meristemática radicular, obteniéndose las raíces tras 24 horas de incubación.

Para la obtención de las preparaciones cromosómicas libres de citoplasma y demás residuos celulares se llevó a cabo un tratamiento enzimático, que supone una modificación de la metodología desarrollada por Schwarzacher y col. (1989), comentado de forma detallada en el apartado *Obtención de Preparaciones Cromosómicas del Anexo I.8. Hibridación in situ con fluorescencia*.

Las sondas utilizadas fueron marcadas mediante el método de *nick translation* utilizándose el kit de marcaje *Bionick Labeling System* (Gibco BRL) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Este método fue aplicado para marcar sondas tanto con biotina como con digoxigenina (*biotina-16-dUTP* y *digoxigenina 11-dUTP*

(Roche). En todos los casos se partió de 1 µg de ADN, dejando un tiempo de 2 horas de incubación. Los fragmentos obtenidos tenían un tamaño de entre 50-500 pb. Se utilizó el marcaje de las sondas de los genes estudiados con biotina, al tiempo que se utilizaba la sonda pTa794 marcada con digoxigenina, para la identificación de los cromosomas.

La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Heslop-Harrison y col., (1991) con ligeras modificaciones (*Anexo I.8. Hibridación in situ con fluorescencia*).

Para la selección de las preparaciones se utilizó un microscopio de contraste de fase, y para visualizar las señales de hibridación se usó un microscopio *Standard Zeiss Axiophot*, dotado de un equipo de epifluorescencia con lámpara de mercurio de 50W, objetivos *Plan-Neofluor* y filtros adecuados.

3.10. ENSAYOS DE RT-PCR CUANTITATIVA

Se realizaron ensayos de PCR cuantitativa para analizar los niveles de expresión de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*. Para ello se realizó una cuantificación relativa de la expresión tomando como control endógeno para la normalización de los datos el gen ribosomal *18S*.

En el caso del gen *Mre11* se empleó una tinción con *SYBR Green* (Applied Biosystems) que se une de forma no específica a moléculas duplexas de ADN. Para los genes *Rad50* y *Nbs1* se usó el sistema de sondas de tipo “taqman” *Universal Probe Library* (UPL, Roche) específicas para cada uno de ellos así como para el gen *18S* usado como control endógeno. Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo usando los termocicladores *ABI Prism 7000* (Applied Biosystems) en el caso de *Mre11*, y *7500 Fast Real-Time PCR system* (Applied Biosystems) para los genes *Rad50* y *Nbs1*.

Para cada uno de los genes se comprobó la eficiencia de amplificación. Para ello se realizaron diluciones seriadas tanto del gen problema como del control endógeno y se obtuvo una curva estándar de acuerdo con lo descrito por Livak y col. (2001).

Material es y Métodos

En cada experimento se realizaron amplificaciones dobles para cada muestra ensayada. Además, todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados de expresión se analizaron siguiendo el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y col., 2001).

SYBR Green

En el caso del gen *Mre11* las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 30 μ l que contenían 3 μ l del ADN copia obtenido tras la reacción de RT, 900 nM de cada oligonucleótido (*Mre11* qPCR-L2: 5' CCCACAAAGTGGACGGAAGA 3'; *Mre11* qPCR-R2: 5' GCTTGGCATGGAACCAAGTGT 3') y 1X *SYBR Green mix* (Applied Biosystems). Las reacciones para el control endógeno del gen *18S* se realizaron en volúmenes de 25 μ l con 1 μ l de ADN copia, 166 nM de los oligonucleótidos (*18S* RNA-L: 5' AATTGTTGGTCTTCAACGAGGAA 3'; *18S* RNA-R: 5' AAAGGGCAGGGACG TAGTCAA 3') y 1X *SYBR Green mix* (Applied Biosystems).

Las condiciones de la reacción fueron 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Sondas UPL

Se eligieron las sondas *UPL* como método de detección en el caso de los genes *Rad50* y *Nbs1*. En estos casos las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 30 μ l partiendo de 3 μ l de ADN copia, 0,5 μ l de las sondas #138 y #88 *Universal probe library* (Roche) (para *Rad50* y *Nbs1*, respectivamente), 1X *Probe master mix* (Roche) y 0,33 mM de cada oligonucleótido (qRad-L: 5' GCATAAGAGTGCTGCATTTTTC 3' y qRad-R: 5' AGAT GCAGCATACAACAGAAAGA 3' para el gen *Rad50*; y qNbs-L3: 5' TTGAACCACCT GCTTACATGA 3' y qNbs-R4: 5' CATCAGAATCCGCCACAATA 3' para *Nbs1*).

Las reacciones para el análisis del control endógeno del gen *18S* se realizaron en un volumen de 25 μ l con 1 μ l de ADN copia como molde, 0,25 μ l de la sonda #131 *Universal probe library* (Roche), 1X *Probe master mix* (Roche) y 0,2 mM de cada oligonucleótido (q18S-L: 5' GGTCGCAAGGCTGAACTTA 3'; q18S-R: 5' TTCCCC GTGTTGAGTCAAAT 3').

Las condiciones de todas estas reacciones fueron un primer ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 59°C. Los datos fueron analizados utilizando el software propio del termociclador (Applied Biosystems).

3.11. ENSAYOS DE SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*)

Se utilizó la técnica de SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*) para estudiar los niveles de expresión relativa de cada uno de los genes expresados a partir de los distintos genomas en las especies alopoloides de trigo (genes homeólogos).

Se empleó una técnica de SSCP por fluorescencia basada en la descrita por Cronn y Adams (2003). Las modificaciones principales con respecto a la técnica original consistieron en la amplificación mediante PCR con oligonucleótidos marcados con fluorescencia, en sustitución del marcaje mediante radiactividad, para lo que se utilizó una molécula del fluoróforo 6-FAM en el nucleótido del extremo 5' del cebador. Además se empleó un analizador genético *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) para la detección automática de los fragmentos amplificados, sustituyendo así el uso de geles desnaturalizantes de acrilamida.

La amplificación se realizó por PCR para cada uno de los genes utilizando oligonucleótidos específicos (Mre11 SSCP-L, Mre11 SSCP-R, Mre11 SSCP-R2, SSCP Rad50-L, SSCP Rad50-R5, SSCP Nbs1-L3, SSCP Nbs1-R3; ver tablas del *Anexo II - Oligonucleótidos*), purificándose posteriormente el fragmento amplificado en cada caso. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 30 μ l, tomando 1 μ l de ADN copia como molde, 0,3 μ M de cada oligonucleótido, 100 μ M de dNTPs, 2 U de taq polimerasa y 1X tampón de la polimerasa.

A partir del fragmento resultante de esta primera amplificación, se realizó una segunda reacción de amplificación, empleando en este caso solamente uno de los cebadores utilizados anteriormente pero marcado con 6-FAM. Para esta segunda reacción se partió de 5 ng del fragmento previamente amplificado y purificado, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M del oligonucleótido-6-FAM, 175 μ M de dNTPs 0,6 U de taq polimerasa, y 1X de tampón de la taq, en un volumen de 10 μ l.

El producto de la reacción de PCR fue diluido en agua ultra pura (UP) (1:40) y de aquí se tomaron 5 μ l a los que se añadieron 20 μ l de formamida y 0,5 μ l del estándar *Rox500* (Applied Biosystems). Los análisis de fluorescencia se llevaron a cabo en el analizador genético usando un capilar de 50 cm y el polímero *POP-7* (Applied

Biosystems). Se usaron las condiciones establecidas por defecto excepto para la temperatura que se estableció en 18°C.

3.12. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

Para los ensayos de interacción de proteínas mediante la técnica del doble híbrido se utilizó el kit *Matchmaker LexA Two-Hybrid system* (Clontech). La cepa de levaduras en que se llevaron a cabo los ensayos fue *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 transformada con el plásmido p8op-lacZ.

Para ensayar las distintas interacciones se clonaron las moléculas de ADN copia correspondientes a los genes homeólogos de *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1* en cada uno de los dos vectores de clonación del sistema, pGilda y pB42AD.

Mre11

Se realizó la amplificación por PCR a partir de ADN copia con los cebadores Mre11 TH-L y Mre11 TH-R (5' CGCGGATCCCAGCAGAGGCAATGGA 3' y 5' ATAGTTTAGC GGCCGCAGAATCATCTCCTCTTGAC 3'), que contienen dianas para *Bam*HI y *Not*I, respectivamente. Posteriormente se digirió el fragmento con estas dos enzimas de restricción, y una vez purificado el fragmento se ligó en el plásmido pGilda previamente digerido con *Bam*HI y *Not*I. Los clones obtenidos se secuenciaron para asegurar que no hubiera ningún error en la secuencia y que había quedado en el marco de lectura apropiado.

Para clonar *Mre11* en pB42AD se partió de las construcciones ya obtenidas en pGilda, y a partir de éstas se digirió con *Eco*RI y *Xho*I para liberar el ADN copia. La secuencia de ADN copia de *Mre11* contenía dos blancos *Eco*RI, por ello se siguió una estrategia de digestiones parciales para liberar el fragmento deseado de pGilda. Una vez obtenido el fragmento se clonó en pB42AD digerido con *Eco*RI/*Xho*I, e igualmente se secuenciaron los clones para comprobar su validez.

Rad50

A partir de los clones de ADN copia obtenidos previamente se llevaron a cabo reacciones de PCR con los cebadores Rad TH-L y Rad TH-R2 (5' CCGGAATTCATGAGCACGGT

GGACAAGA 3' y 5' CCGGAATTCTTAGTCAAATATCTCTTGGGC 3'), ambos con dianas para *EcoRI*. Los fragmentos resultantes de la amplificación se digirieron con *EcoRI*, y se clonaron en pGilda y pB42AD digeridos también con *EcoRI*. Los clones obtenidos fueron secuenciados para comprobar que la secuencia no contenía errores, y que el marco de lectura y la orientación del inserto eran correctos.

Nbs1

Se amplificó a partir de los clones ya obtenidos de los ADN copia con los cebadores Nbs1 TH-L y Nbs1 TH-R2 (5' TCTCTTGAATTCATGGTCTGGGCGCTGA CC 3' y 5' AGTTTGCTCGAGTCATCGGCAACCGGTGAGC 3'). Estos cebadores contienen dianas *EcoRI* y *XhoI*, respectivamente. Posteriormente se digirieron los fragmentos amplificados con estas enzimas y se clonaron en pGilda y pB42AD digeridos con *EcoRI/XhoI*. Igual que en los casos anteriores se secuenciaron los clones obtenidos.

Cada interacción se probó por triplicado en tres ensayos diferentes, y además se probó en ambas direcciones, clonando cada uno de los ADN copia tanto en pGilda como en pB42AD. En cada ensayo se introdujo también un control negativo y un control positivo. Así mismo, por cada interacción probada se llevaron a cabo controles de autoactivación y toxicidad para cada una de las dos proteínas híbridas implicadas en la interacción.

Para los ensayos de interacción se llevaron a cabo transformaciones dobles de la cepa EGY48 [p8op-lacZ] con los dos plásmidos híbridos (ver apartado *Cultivo y transformación de S. cerevisiae* del Anexo I.9. *Ensayos de doble híbrido en levaduras*). Las mezclas de co-transformación se sembraron en placas con medio SD/His⁻/Trp⁻/Ura⁻, que permite seleccionar colonias portadoras de ambos plásmidos híbridos, así como el plásmido p8op-lacZ.

Como control negativo se realizó una transformación doble con los plásmidos pGilda y pB42AD, y como control positivo se co-transformó con los plásmidos híbridos pLexA-Pos y pB42AD-T, suministrados por la casa comercial. El plásmido pLexA-Pos codifica para una proteína de fusión con el dominio ADN-BD de pGilda y el dominio AD de GAL4, proporcionando un control positivo para el ensayo de la β -galactosidasa. El plásmido pB42AD-T codifica para una proteína de fusión AD/T-antígeno de SV40, y proporciona igualmente un control positivo.

Materiales y Métodos

Se realizaron dos ensayos distintos para la detección de interacciones entre las proteínas híbridas. El ensayo de la β -galactosidasa en filtro, que detecta la expresión del gen delator *lacZ*, y el ensayo de crecimiento, que detecta la expresión del gen delator *LEU2*. En el *Anexo I.9. Ensayos de doble híbrido en levaduras* se describe detalladamente ambos ensayos.

El ensayo de la β -galactosidasa en filtro se realizó a partir de nueve colonias seleccionadas al azar de las placas SD (con glucosa). En este ensayo se incluyeron todas las interacciones a probar, así como los controles positivos y negativos, realizándose igualmente controles de autoactivación.

Para los ensayos de crecimiento se partió de 2 ó 3 colonias de levaduras del medio SD (glucosa) que fueron incubadas a 30°C durante 10 días, observando el crecimiento a los 4 y 10 días desde la inoculación.

Además se llevaron a cabo ensayos de toxicidad, para comprobar que las proteínas híbridas expresadas no resultaban tóxicas para las células; y controles de autoactivación para descartar que la activación de los genes delatores viniera dada por la expresión de una única proteína híbrida, y no por la interacción de ambas, siguiendo siempre el protocolo proporcionado por la casa suministradora. En los ensayos de toxicidad se cogieron como inóculos 2 ó 3 colonias de los medios SD (glucosa) incubando durante 10 días a 30°C, comparando el crecimiento observado en estas placas con el de los ensayos de crecimientos. A la vez que se realizaron los ensayos de interacción se llevaron a cabo controles de autoactivación. Para llevar a cabo estos controles se transformaron levaduras con un solo plásmido híbrido y se verificaron de esta forma todos los plásmidos usados en los diferentes ensayos de interacción, siguiendo el protocolo detallado en el *Anexo I.9. Ensayos de doble híbrido en levaduras*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados correspondientes a los objetivos de este trabajo. En primer lugar se describen los intentos de obtención de una serie de plantas transformadas, primero en trigo y después en cebada, portadoras de las construcciones necesarias para llevar a cabo los ensayos de recombinación. En segundo lugar se exponen los resultados de los análisis de los genes del sistema MRN en los tres genomas (A, B y D) del trigo, registrándose los estudios del aislamiento, la caracterización molecular de los genes y proteínas codificadas, la comparación con los de otras especies, la localización cromosómica en su caso y el análisis de la expresión cuantitativa en las formas diploides y poliploides.

4.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL PARA EL ESTUDIO DEL MECANISMO DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

El primer bloque en que se divide el presente trabajo, en el que se trata de analizar el mecanismo y la frecuencia de la recombinación homóloga en cereales, se inició con la obtención de plantas portadoras de las construcciones pIU.GUS, pDU.GUS, pGU.US, pCISceI y pAR-ISceI (*Figura 4.1*). La transformación se llevó a cabo por agroinfección con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*, y se transformaron embriones inmaduros de la variedad ‘Golden Promise’ de cebada, así como de las variedades ‘Chinese Spring’, ‘Florida’, ‘Bobwhite 26’ y ‘Bobwhite 29’ de trigo.

Se abordaron varias estrategias de transformación realizadas en sucesivas temporadas, que se describen a continuación.

Transformación de las variedades de trigo ‘Chinese Spring’, ‘Florida’, ‘Bobwhite 26’ y ‘Bobwhite 29’

En la primera temporada se transformaron en total 4.220 embriones inmaduros entre las cuatro variedades de trigo ya mencionadas con las construcciones descritas (*Tabla 4.1*).

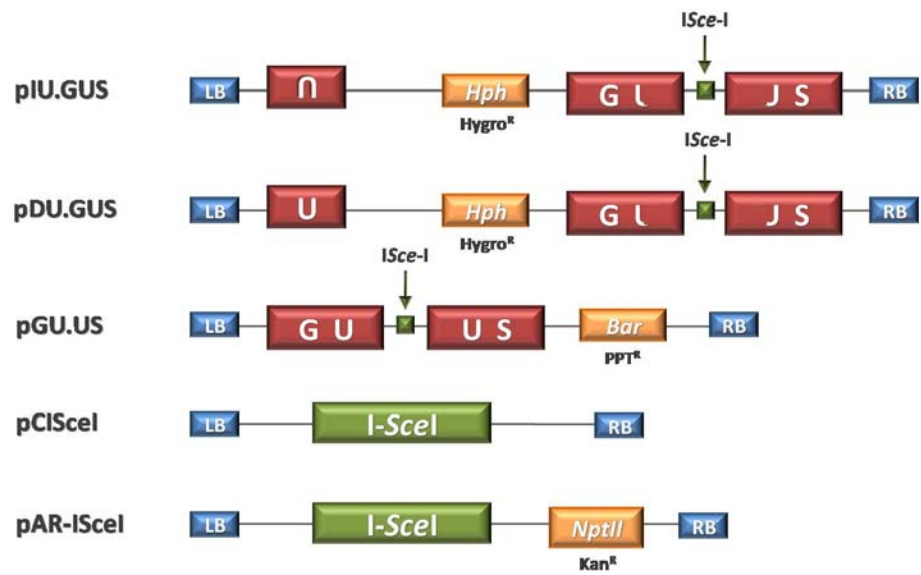


Figura 4.1 Esquema de las construcciones diseñadas para el estudio del mecanismo de recombinación homóloga. Las construcciones pIU.GUS y pDU.GUS portan el gen GUS interrumpido por una diana para la enzima de restricción I-SceI. Aguas arriba llevan un fragmento de este gen, en posición invertida o directa, respectivamente. La construcción pGU.US lleva el gen GUS interrumpido por la diana para I-SceI, pero a ambos lados de la diana hay regiones solapantes del gen GUS. Las construcciones pCI-SceI y pAR-ISceI son portadoras del gen que codifica para la enzima de restricción I-SceI, diferenciándose entre ellas en la presencia del gen NptII que confiere resistencia a kanamicina. La construcción pAR-ISceI se obtuvo posteriormente al inicio de los ensayos, por lo que durante las primeras temporadas de transformación se trabajó con la construcción pCISceI en su lugar.

Variedad	pIU.GUS	pDU.GUS	pDGU.US	pCISceI
‘Bobwhite 26’	376	468	439	530
‘Bobwhite 29’	173	205	225	187
‘Florida’	275	325	337	315
‘Chinese Spring’	88	100	82	95

Tabla 4.1 Número de embriones inmaduros transformados con cada una de las construcciones para las cuatro variedades de trigo.

Se llevó a cabo un período de inducción de la formación de callos y regeneración de plántulas con la adecuada selección para cada una de las construcciones, de forma que para seleccionar las plantas transformadas con las construcciones pIU.GUS y pDU.GUS se empleó el antibiótico higromicina, y para la selección de la construcción pGU.US se empleó el herbicida fosfinotricina. En el caso de la construcción pCISceI, ésta no contenía ningún marcador que permitiera seleccionar las formas procedentes de transformación, de forma que fueron cultivadas sin ningún tipo de selección sobre las plantas transgénicas. Se regeneraron un total de 25 plántulas, de las cuales dos de ellas

habían sido transformadas con la construcción pIU.GUS, cinco con la construcción pDU.GUS, doce plantas para pGU.US y seis para pCISceI (Tabla 4.2). Estas plantas se analizaron por PCR, empleándose la pareja de cebadores Hyg-L/Hyg-R que amplifica un fragmento de unas 450 pb del gen *Hph* en el caso de las plantas transformadas con las construcciones pIU.GUS y pDU.GUS; los cebadores Bar-Fw/Bar-Rev en el caso de la construcción pGU.US, que amplifican un fragmento de unas 500 pb del gen *Bar*; y los cebadores 35S-L/ISce-R para la construcción pCISceI, amplificando un fragmento de algo más de 700 pb que comprende parte del promotor 35S y el inicio del gen para la enzima ISce-I. Así mismo se realizaron ensayos de Southern blot empleando como sondas estos mismos fragmentos. En ninguno de los casos se pudo confirmar la presencia del transgén, lo que supone que todas las plantas regeneradas serían escapes a la selección, con excepción de aquellas transformadas con la construcción pCISceI que no fueron sometidas a ningún tipo de selección.

Construcción	Embriones transformados	Plántulas regeneradas	Positivos por PCR	Positivos por Southern Blot
pIU.GUS	912	2	0	0
pDU.GUS	1.098	5	0	0
pDGU.US	1.083	12	0	0
pCISceI	1.127	6	0	0

Tabla 4.2 Resumen de datos de la transformación de trigo. Se han agrupado según la construcción empleada, sin hacer distinción entre las distintas variedades de trigo.

En la siguiente temporada se escogieron dos de estas variedades de trigo por ser las que presentan mejores tasas de regeneración, y además se empleó la cebada. Se transformaron en total 2.627 embriones de la variedad ‘Bobwhite 26’ y 3.043 embriones de la variedad ‘Florida’, con las cuatro construcciones según se describe en la siguiente tabla (Tabla 4.3). Los resultados obtenidos para la transformación de cebada se indican en el siguiente apartado.

Variedad	pIU.GUS	pDU.GUS	pDGU.US	pCISceI
Bobwhite26	675	627	668	657
Florida	764	721	727	831

Tabla 4.3 Número de embriones inmaduros transformados con cada una de las construcciones para las dos variedades de trigo.

Resultados

Tras la transformación de los embriones mediada por *Agrobacterium* y el posterior paso por una etapa de callo, comenzaron a regenerarse plántulas que fueron sometidas a una selección mediante el antibiótico o el herbicida añadidos a los medios de regeneración. Tras esta selección sólo se obtuvieron plantas procedentes de los embriones transformados con la construcción pCISceI, un total de 20 plantas, mientras que en el caso de las otras tres construcciones no regeneró ninguna planta tras el período de selección. Se analizaron las plantas obtenidas para la construcción pCISceI mediante PCR para determinar la presencia o no del transgén. Se empleó para ello la pareja de cebadores 35S-L/ISceI-R que amplificaba un fragmento de aproximadamente 700 pb, sin encontrarse ninguna planta que contuviese el transgén. Para confirmar esto se realizaron también ensayos de Southern Blot usando como sonda el fragmento amplificado con los cebadores mencionados anteriormente, marcado con digoxigenina. Los resultados obtenidos fueron los mismos, no encontrándose ninguna planta transgénica.

Transformación de la variedad de cebada ‘Golden Promise’

Dados los escasos resultados obtenidos en la primera tanda de transformación de trigo, en la siguiente ronda se realizaron conjuntamente con los experimentos de trigo anteriormente comentados, experimentos de transformación de otro cereal, la cebada, utilizando la variedad ‘Golden Promise’, transformándose en un primer momento un total de 3.105 embriones (*Tabla 4.4*).

Al igual que en el caso de los trigos, se realizó una selección de los embriones transformados añadiendo bien higromicina (pIU.GUS y pDU.GUS) o fosfinotricina (pGU.US) a los medios empleados durante el proceso de cultivo para la obtención de callos y la regeneración de plántulas. Tras este proceso de selección, se obtuvieron siete plantas resistentes a la selección en el caso de la construcción pIU.GUS, ocho plantas resistentes para pDU.GUS, y treinta y seis plantas en el caso de la transformación con pGU.US. En el caso de los embriones transformados con la construcción pCISceI, al no llevar ésta ningún tipo de marcador seleccionable para la detección de los eventos de transformación, regeneraron al menos dos mil plántulas, de las cuales se seleccionaron aleatoriamente 720 plantas que serían posteriormente analizadas mediante PCR.

Construcción	Embriones transformados	Plántulas regeneradas	Positivos por PCR	Positivos por Southern Blot	Plantas con semillas
pIU.GUS	806	7	4	4	2
pDU.GUS	764	8	1	1	0
pDGU.US	773	36	19	19	12
pCISceI	762	>2.000	1	1	0

Tabla 4.4 Datos sobre la transformación de cebada con las distintas construcciones. Se indica el número de embriones transformados con cada construcción, las plántulas regeneradas resistentes a la selección y las transgénicas obtenidas en cada caso.

Todas estas plántulas regeneradas, resistentes a la selección aplicada durante el proceso de cultivo *in vitro*, fueron analizadas en primer lugar mediante PCR con unas parejas de cebadores específicas que amplificaban parte del transgén con el que se había transformado la planta. En el caso de las construcciones pIU.GUS y pDU.GUS se emplearon las parejas de cebadores GUS-L/GUS-R e Hyg-L/Hyg-R para detectar, respectivamente, la presencia del gen *Gus* y del gen *Hph* en el genoma de las distintas plantas. La primera pareja de cebadores amplificó un fragmento de unas 400 pb del gen *Gus* incluido en las construcciones, mientras que Hyg-L/Hyg-R amplificó un fragmento de unas 500 pb del gen *Hph*. Tras el análisis por PCR de estas plantas se detectó la presencia del transgén en cuatro de las siete plantas analizadas en el caso de la construcción pIU.GUS y sólo una de las ocho plantas resistentes a la selección resultó presentar el transgén en el caso de la construcción pDU.GUS (Figura 4.2).

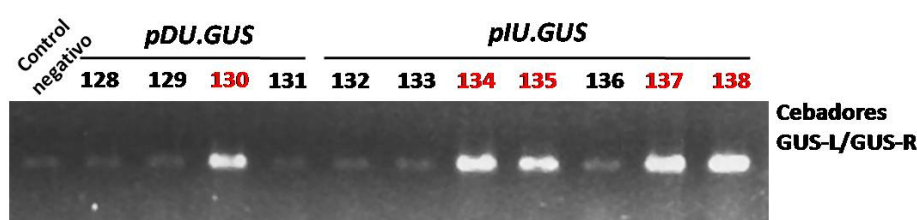


Figura 4.2 Análisis mediante PCR de algunas de las plantas regeneradas. En el gel se encuentran las muestras de 5 plantas transformadas con pDU.GUS y 7 plantas transformadas con pIU.GUS. En este caso se emplearon los cebadores GUS-L/GUS-R. Los números en la parte superior identifican las plantas, y el color rojo marca las plantas positivas por PCR.

Las plántulas que resultaron resistentes a fosfinotricina transformadas con la construcción pGU.US fueron igualmente analizadas por PCR, empleando para ello dos parejas de cebadores, por un lado la pareja previamente utilizada GUS-L/GUS-R para amplificar un fragmento del gen *Gus*, y por otro la pareja Bar-Fw/Bar-Rev que amplifica un fragmento de 500 pb del gen *Bar* (Figura 4.3). En este caso se encontró que de las

Resultados

treinta y seis plantas regeneradas y analizadas por PCR, diecinueve contenían el transgén pues en todas ellas se amplificaron ambos genes.

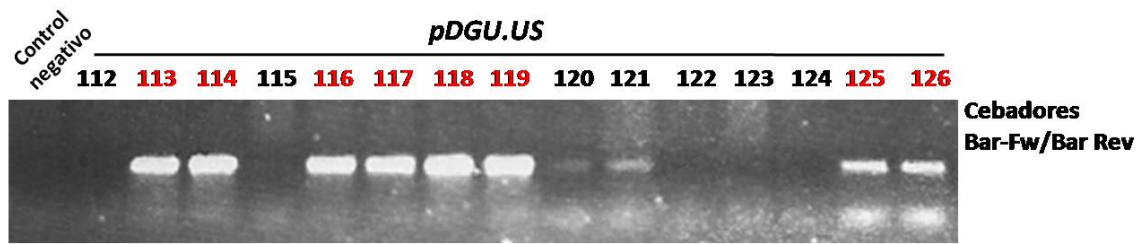


Figura 4.3 El gel contiene las muestras de 16 plantas procedentes de la transformación con la construcción pGU.US, amplificados con los cebadores Bar-Fw/Bar-Rev. Los números en la parte superior identifican las plantas, y el color rojo marca las plantas positivas por PCR.

De las plantas transformadas con la construcción pCISceI, al no llevar ésta ningún tipo de agente de selección, se obtuvieron más de dos mil plántulas regeneradas a partir de los callos obtenidos, de las cuales 720 fueron analizadas mediante PCR empleando la pareja de cebadores 35S-L/ISceI-R utilizados anteriormente. Se encontró una planta positiva para la presencia del transgén que fue confirmada mediante Southern Blot, aunque esta planta murió antes de llegar a dar semillas.

Las plantas en las que se obtuvo un resultado positivo mediante los análisis por PCR, fueron analizadas mediante Southern Blot para confirmar la presencia del transgén en su genoma. Además, mediante estos análisis, se pudo también determinar el número de copias del transgén que se integraron en el genoma de las plantas. Para ello se cortó el ADN genómico de las plantas con una enzima de restricción con una única diana de corte en la secuencia del segmento de ADN que se integra en la planta, de forma que permite determinar el número de copias del transgén. La hibridación se llevó a cabo con una sonda marcada con digoxigenina y amplificada con los mismos cebadores usados en los análisis por PCR. En las Figuras 4.4 y 4.5 se muestran los resultados de estos ensayos para algunas de las plantas analizadas.

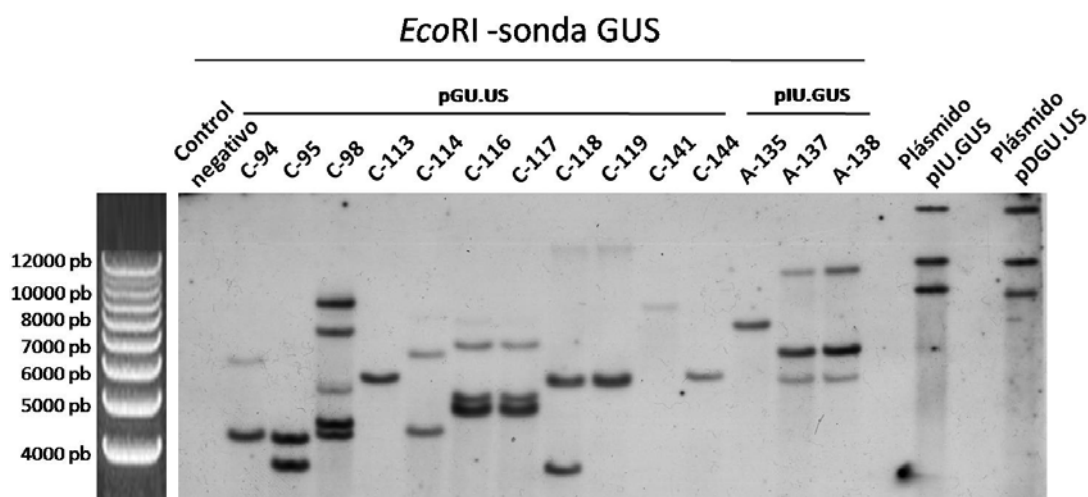


Figura 4.4 Análisis mediante Southern Blot de las plantas positivas por PCR. Las muestras fueron cortadas con la enzima EcoRI e hibridadas con una sonda del gen Gus. El número de bandas indica el número de copias del transgén integradas en el genoma de la planta.

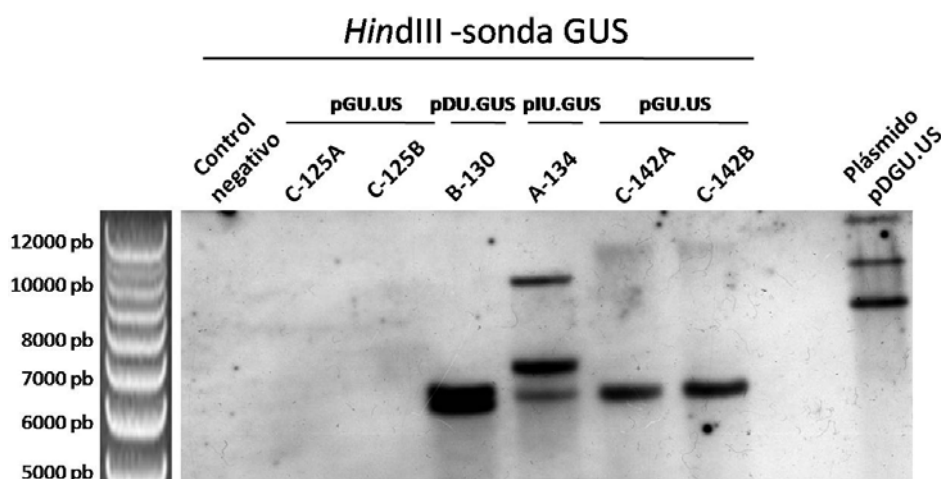


Figura 4.5. Análisis mediante Southern Blot de las plantas transgénicas obtenidas mediante PCR. Las muestras fueron cortadas con la enzima HindIII e hibridadas con la misma sonda para el gen Gus. El número de bandas indica el número de copias del transgén integradas en el genoma de la planta.

No todas las plantas transgénicas detectadas por Southern blot llegaron a florecer de modo que sólo se pudo recoger semillas de las plantas que se indican a continuación: pIU.GUS: A-135 y A-137; pGU.US: C-75, C-76, C-95, C-98, C-100, C-113, C-116, C-117, C-118, C-119, C-141, y C-142. Las plantas transgénicas para las construcciones pDU.GUS y pCISceI no llegaron a dar semilla. Las plantas que aparecen subrayadas en la lista anterior presentan una única copia del transgén, y serán las elegidas para realizar los ensayos posteriores.

Resultados

La construcción pCISceI usada inicialmente no contenía ningún tipo de marcador que permitiera seleccionar las plántulas que eran transgénicas para dicha construcción. Esto hizo muy complicado la obtención de plantas transgénicas para esta construcción, ya que se trabajó con un gran volumen de plántulas regeneradas que hubo que analizar por PCR para detectar la presencia del transgén. Por ello se empleó una nueva construcción denominada pAR-ISceI, que procede a su vez del plásmido pCISceI al que se incorporó el gen *NptII*, que confiere resistencia a kanamicina. Con esta construcción se transformaron nuevos embriones de cebada.

En una primera tanda de transformación se inocularon 1.273 embriones inmaduros de la variedad ‘Golden Promise’, con la nueva construcción pAR-ISceI. Tras el proceso de transformación se llevó a cabo una selección de los embriones transformados mediante la adición a los medios del antibiótico kanamicina. Tras este proceso se obtuvieron 72 plantas resistentes a esta selección que serían analizadas por PCR para detectar la presencia del transgén. En este caso se emplearon dos parejas de cebadores, por un lado K3/K4 que amplifica un fragmento de 650 pb del gen *NptII*, y por otro lado ISceI-L1/ISceI-R que amplifica un fragmento de 500 pb del gen de la enzima de restricción *I-SceI*.

De las 72 plantas regeneradas parte murieron, y sólo se pudieron analizar 51 plantas, de las cuales sólo una dio positivo en los análisis de PCR. Estos resultados fueron confirmados mediante Southern blot, aunque finalmente la planta no llegó a dar semilla (Tabla 4.5).

Construcción	Embriones transformados	Plántulas regeneradas	Positivos por PCR	Positivos por Southern Blot	Plantas con semillas
pAR-ISceI	1.273	72	1	1	0

Tabla 4.5 Datos sobre la transformación de embriones de cebada con la construcción pAR-ISceI.

Se llevó a cabo una segunda tanda de transformación de 1.088 embriones inmaduros con la construcción pAR-ISceI. El proceso de selección se realizó igual que en el caso anterior, obteniéndose ahora 51 plantas resistentes a la selección por kanamicina (Tabla 4.6).

Estas plantas fueron todas ellas analizadas por PCR con las dos parejas de cebadores comentadas anteriormente (Figura 4.6) obteniendo un total de 16 plantas positivas.

Construcción	Embriones transformados	Plántulas regeneradas	Positivos por PCR	Positivos por Southern Blot	Plantas con semillas aún creciendo
pAR-ISceI	1.088	51	16	13	

Tabla 4.6 Resumen de datos de la segunda tanda de transformación de cebada con la construcción pAR-ISceI.

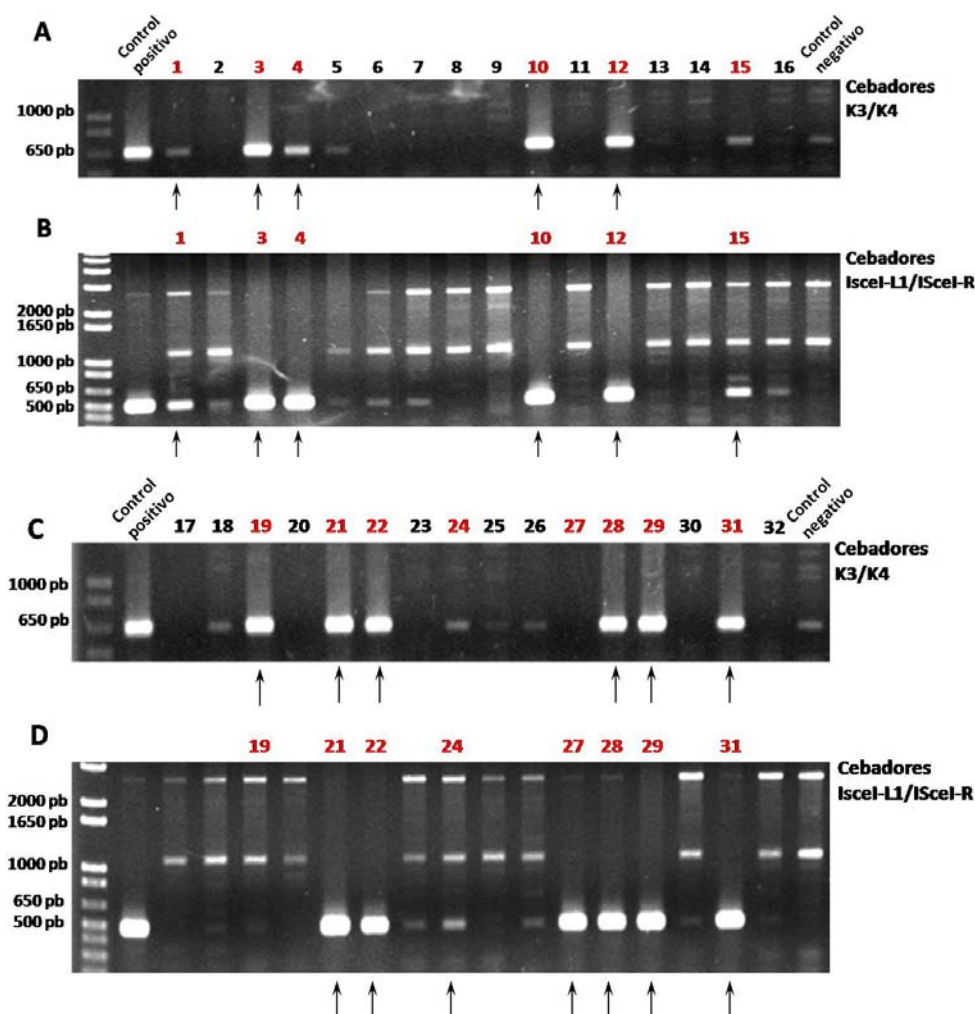


Figura 4.6 Análisis mediante PCR de las plantas regeneradas que fueron transformadas con la construcción pAR-ISceI. (A y C) PCR con los cebadores K3/K4. (B y D) PCR con los cebadores ISceI-L1/ISceI-R. Las flechas marcan las señales de amplificación consideradas como resultado positivo. Los números rojos indican las plantas que se consideraron transgénicas tras los análisis por PCR, previo a la confirmación mediante Southern Blot.

También fueron analizadas mediante Southern Blot para confirmar la presencia del transgén en su genoma (Figura 4.7), confirmándose que 13 de las 16 plantas analizadas contenían el transgén.

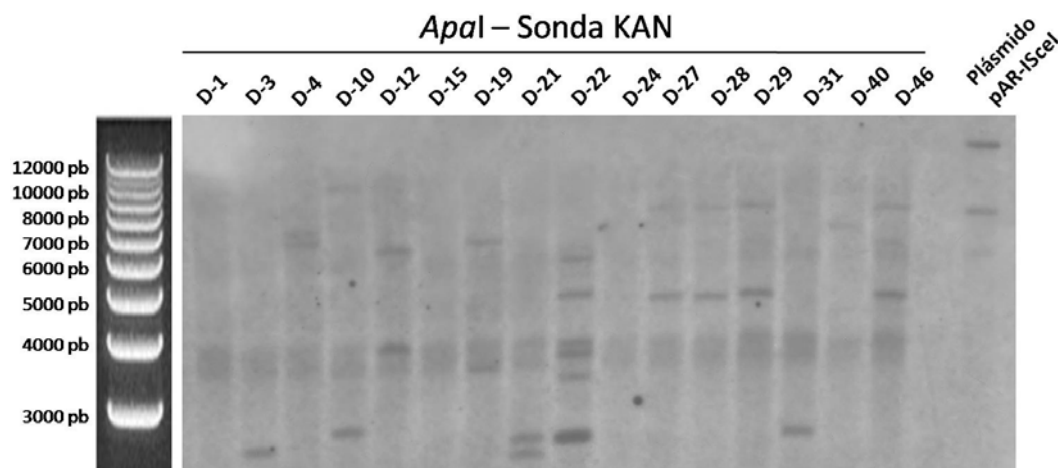


Figura 4.7 Análisis mediante Southern Blot de las plantas positivas por PCR. Las muestras de ADN genómico se digirieron con *ApaI*, y como sonda se empleó un fragmento de unas 650 pb del gen *NptII* (amplificado con los cebadores K3/K4).

Este paso de obtención de plantas transgénicas portadoras de las construcciones pIU.GUS, pDU.GUS, pGU.US y pAR-IsceI es el punto de partida para realizar el estudio sobre el mecanismo de recombinación homóloga en cereales.

4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN Y DE INTERACCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO MRN

4.2.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La segunda parte del trabajo desarrollado ha consistido en la caracterización de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1* en trigo, componentes del complejo MRN. Para ello se ha trabajado con las especies diploides *Triticum monococcum* ($2n=2x=14$; AA) y *Aegilops tauschii* ($2n=2x=14$; DD), y con la especie tetraploide *Triticum turgidum* cv. ‘Vitrón’ ($2n=4x=28$; AABB), que permitieron llevar a cabo una caracterización molecular de los genes homeólogos en los tres genomas de trigo A, B y D. Así se han obtenido tanto las secuencias genómicas, como las secuencias de ADN copia para todos ellos.

A partir de las especies diploides *T. monococcum* y *Ae. tauschii* se obtuvieron las secuencias pertenecientes a los genomas de trigo A y D, respectivamente. Para la

obtención de las secuencias del genoma B se empleó la especie tetraploide *T. turgidum* cv. ‘Vitrón’, a partir de la cual se obtuvieron dos grupos de secuencias que se asociaron con las pertenecientes a los dos genomas A y B, llegando a identificar las secuencias correspondientes al genoma A por comparación con las obtenidas a partir de *T. monococcum*.

Para realizar esta caracterización se aisló tanto el ADN genómico como el ARN total de las diferentes especies de trigo. Se buscó la información sobre estos genes disponible en las bases de datos, y se trabajó con las secuencias ya descritas en especies vegetales, como arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis thaliana*, y así mismo se emplearon secuencias de *ESTs* de especies relacionadas como maíz (*Zea mays*), centeno (*Secale cereale*), cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*). Se ordenó toda la información recopilada y sobre las zonas más conservadas se procedió a diseñar cebadores para la posterior amplificación de estas secuencias. Este procedimiento se detalla más adelante para cada uno de los tres genes caracterizados.

Una vez diseñados los cebadores específicos para cada uno de los genes, se llevaron a cabo las reacciones de amplificación por PCR tomando como ADN molde tanto el ADN genómico como el ADN copia sintetizado a partir del ARN total extraídos de las distintas especies estudiadas. Los fragmentos obtenidos tras la amplificación se purificaron y clonaron en vectores adecuados para su posterior secuenciación.

En muchos casos se probaron varias combinaciones de cebadores con los que no se consiguió amplificar los fragmentos deseados, estos cebadores fueron desechados, y en este trabajo sólo se mencionan aquellos que dieron un resultado positivo a la hora de amplificar los fragmentos buscados.

4.2.1.1. Caracterización del gen *Mre11*

Caracterización molecular de *Mre11*

Para la obtención de las secuencias genómicas de los genes homeólogos *Mre11* de trigo hubo que dividir el gen en dos fragmentos solapantes debido a su tamaño, y estos fragmentos se denominaron F1 y F2. Para su amplificación se emplearon las parejas de cebadores Mre11-L/Mre11-R2 y Mre11-L2/Mre11-R, respectivamente. Estos

Resultados

oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia de ADN copia de *Mre11* ya descrita en arroz y de un total de seis secuencias *ESTs*, dos de ellas de trigo y cuatro de cebada (Figura 4.8). El oligonucleótido Mre11-R2 no fue diseñado partiendo de esta información, sino que se diseñó una vez que se conoció la secuencia para los fragmentos F2, aprovechando la información proporcionada por éstos.

Mre11

ADNc de arroz

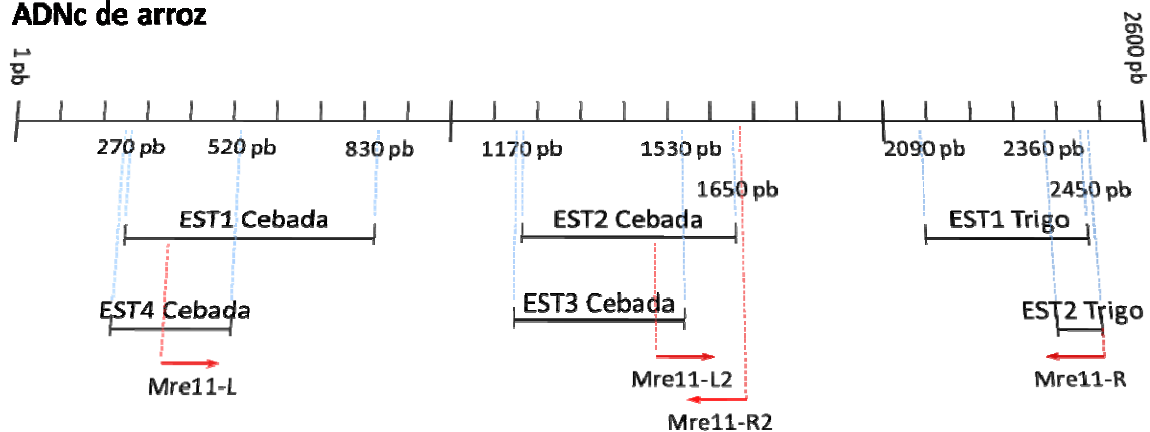


Figura 4.8 Información encontrada en las bases de datos sobre el gen *Mre11*. Se tomó como base la secuencia del ADN copia de arroz (Accesion No. AK070546) y sobre ésta se alinearon seis secuencias *ESTs* de cebada (BM377576, AJ479816, AJ479815 y CA008717) y trigo (BJ231846 y CD373942). Sobre las regiones más conservadas se diseñaron los distintos cebadores (rojo).

Para cada fragmento se obtuvieron varios clones y de todos ellos se secuenciaron al menos tres por fragmento y genoma para obtener la secuencia consenso de cada uno de ellos. En el caso de las especies diploides *T. monococcum* y *Ae. tauschii* todos los clones secuenciados presentaron la misma secuencia, mientras que en la especie tetraploide *T. turgidum* los clones se agruparon por su secuencia en dos grupos diferenciados que se asignaron posteriormente a los genomas A y B. Esta identificación de los genes *Mre11A* y *Mre11B* se realizó por comparación de las secuencias con la obtenida en la especie diploide *T. monococcum*, identificando así la secuencia correspondiente al genoma A de *T. turgidum*, y por tanto la otra secuencia se asignó al genoma B.

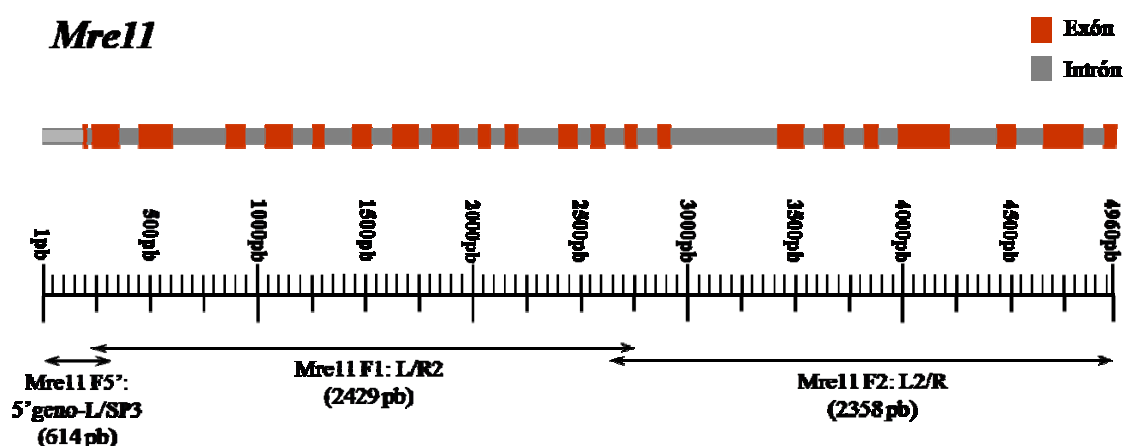
Las secuencias obtenidas de los fragmentos solapantes F1 y F2 se alinearon, y se obtuvo la secuencia completa del gen para cada una de las especies y genomas.

Para obtener la secuencia de ADN copia, ésta se amplificó en un único fragmento usando los cebadores Mre11-L/Mre11-R. Los extremos 3' y 5' fueron amplificados usando el kit 5'/3' RACE y los cebadores específicos Mre11-SP1, Mre11-SP2, Mre11-

SP3 y Mre11-SP5, completando así la secuencia. Al igual que para el ADN genómico, en este caso los clones secuenciados para las especies diploides presentaron todos ellos la misma secuencia, mientras que en la especie tetraploide se identificaron dos tipos de secuencias que se asignaron a los genomas A y B siguiendo el mismo procedimiento que en el caso anterior.

Posteriormente a la obtención de la secuencia de ADN copia, se amplificó la secuencia genómica del gen en la región del extremo 5' hasta 300 pb aguas arriba del codón de inicio, mediante el fragmento denominado F5' que fue amplificado con la pareja de cebadores Mre11 5'geno-L/Mre11 SP3, siendo el primero diseñado sobre las secuencias de ADN copia obtenidas en el extremo 5' mediante la técnica de RACE.

Por comparación de estas secuencias con las genómicas se determinaron los exones e intrones, presentando 22 exones y 21 intrones (*Figura 4.9*). En todos los casos la región codificante del ADN copia presenta un tamaño de 2.100 pb, y codifica para una proteína de 699 aminoácidos. Las diferencias en las secuencias codificantes se deben únicamente a sustituciones puntuales de un nucleótido por otro.



*Figura 4.9 Esquema de la secuencia genómica de Mre11. La barra de la parte superior representa la organización de exones e intrones del gen en trigo. En la parte inferior se muestran los fragmentos en los que se dividió el gen para su amplificación y secuenciación, y los cebadores con los que fueron amplificados. Los datos numéricos están referidos a la especie *T. monococcum*, siendo muy similares para el resto.*

En la *Tabla 4.7* se presenta un resumen de los datos obtenidos tras la secuenciación de los clones procedentes de las secuencias genómicas así como de ADN copia para los tres genes homeólogos *Mre11*.

<i>Mre11</i>	<i>T. monococcum</i> (A)	<i>Ae. tauschii</i> (D)	<i>T. turgidum</i> cv. Vitron (A)	<i>T. turgidum</i> cv. Vitron (B)
Fragmento F1	2.429 pb	2.432 pb	2.403 pb	2.431 pb
Fragmento F2	2.358 pb	2.443 pb	2.367 pb	2.396 pb
Fragmento F5'	614 pb	613 pb	642 pb	587 pb
Gen completo	4.960 pb	5.047 pb	4.971 pb	4.973 pb
N° de acceso	AM049169	AM049172	AM049171	AM049170
<i>ADN copia</i>				
Exones/Intrones	22/21	22/21	22/21	22/21
ADNc codificante	2.100 pb	2.100 pb	2.100 pb	2.100 pb
5' UTR	87 pb	73 pb	175 pb	144 pb
3' UTR	270 pb	283 pb	235 pb	199 pb
ADNc + UTR	2.457 pb	2.456 pb	2.510 pb	2.443 pb
N° de acceso	AM049175	AM049176	AM049174	AM049173

Tabla 4.7 Datos obtenidos acerca de la secuencia genómica de los tres genes homeólogos *Mre11* de trigo, así como las correspondientes secuencias de ADN copia. En la última fila se indican los números de acceso con que se encuentran en la base de datos de secuencias del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Se llevó a cabo un alineamiento de las proteínas MRE11 deducidas a partir de las secuencias de ADN copia para las distintas especies, así como de las proteínas MRE11 disponibles en las bases de datos para otras especies relacionadas como arroz, maíz o *Arabidopsis*, incluyéndose en el mismo también las proteínas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y del hombre. Este alineamiento se recoge en el *Anexo III – Alineamientos de proteínas*.

El grado de homología entre las proteínas MRE11 de las distintas especies de trigo estudiadas es del 98%, y la homología de éstas con la proteína MRE11 de arroz es del 82%, del 85% para el maíz, y 68% en el caso de *Arabidopsis*. Al comparar las proteínas de trigo con la proteína humana la homología encontrada fue del 41%, mientras que en el caso de la proteína de *S. cerevisiae* fue de 29-31%.

La *Figura 4.10* muestra un árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de las proteínas MRE11 que se emplearon en el alineamiento arriba mencionado. Se aprecia la gran proximidad entre todas las proteínas de trigo, especialmente en el caso de las procedentes del genoma A de *T. monococcum* y *T. turgidum*. Se encuentran a su vez próximas a las proteínas de arroz y maíz, más que a la de *Arabidopsis*, mientras que están más alejadas de la proteína humana y de levaduras.

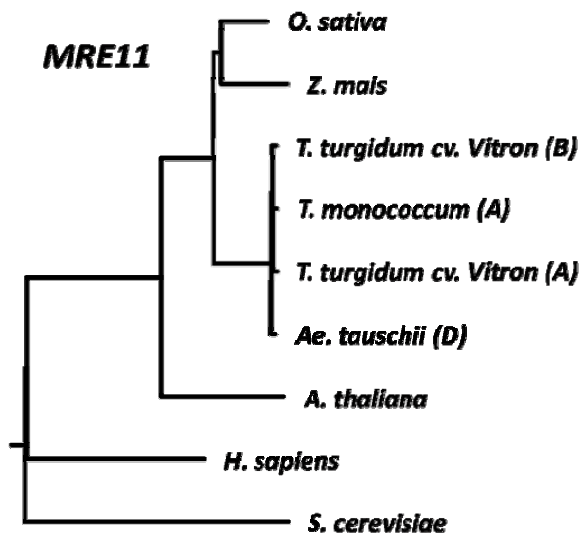


Figura 4.10 Árbol filogenético construido con las proteínas deducidas a partir de la secuencia del ADN copia de los trigos, y de la información disponible en el banco de datos para otras especies

Determinación del número de copias génicas

Se realizaron ensayos de Southern Blot para determinar si los genes caracterizados eran o no de copia única. En estos ensayos, se emplearon las especies diploides *T. monococcum* y *Ae. tauschii*, la especie tetraploide *T. turgidum* cv. ‘Vitron’ y la hexaploide *T. aestivum* cv. ‘Chinese Spring’. Las sondas utilizadas fueron diseñadas sobre regiones del gen que no presentaran grandes diferencias entre las distintas especies, y se marcaron con *digoxigenina-11-dUTP* mediante la amplificación con cebadores específicos, a partir de alguna de las especies de trigo utilizadas en el estudio.

Las enzimas de restricción elegidas para la digestión del ADN genómico fueron *EcoRI* y *HindIII*. La sonda se amplificó empleando los cebadores Mre11 F1Seq-L2/Mre11 F1Seq-R dando lugar a un fragmento de unas 900 pb. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 4.11.

Para cada una de las especies analizadas se obtuvo una señal de hibridación por cada genoma distinto presente en la especie, lo que indica que el gen *Mre11* es un gen de copia única en trigo, de modo que las especies diploides presentan una única copia del gen, la especie tetraploide *T. turgidum* presenta una copia de cada uno de los genes homeólogos (*Mre11A* y *Mre11B*), y la especie hexaploide *T. aestivum* posee una copia de cada uno de los tres genes homeólogos (*Mre11A*, *Mre11B* y *Mre11D*).

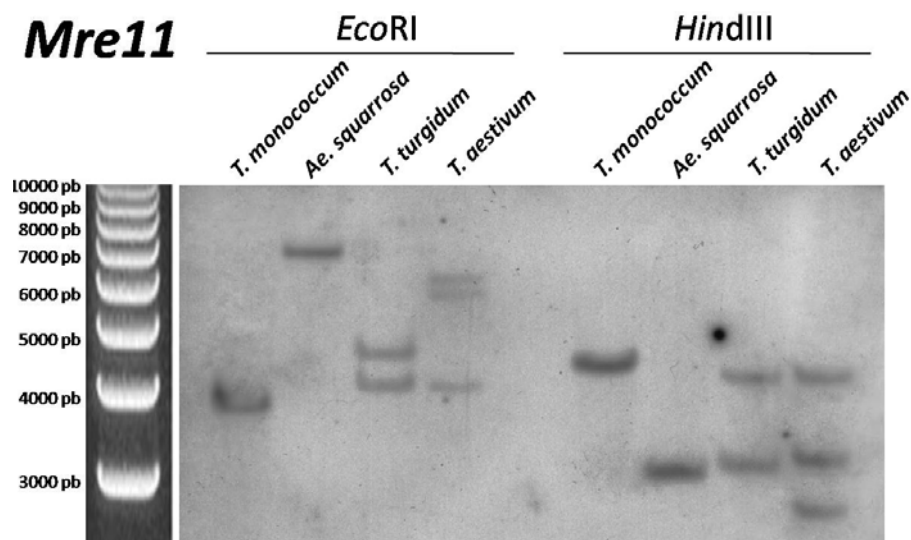


Figura 4.11 Resultado del ensayo de Southern Blot llevado a cabo para determinar el número de copias del gen *Mre11* en las especies de trigo estudiadas.

4.2.1.2. Caracterización del gen *Rad50*

Caracterización molecular de *Rad50*

Debido al gran tamaño de este gen, de más de 16.000 pb en todos los casos, hubo que dividirlo en un total de ocho fragmentos para obtener su secuencia completa. Se diseñaron cebadores apoyándose en la información disponible en las bases de datos sobre las secuencias de ADN copia ya caracterizadas en arroz y *Arabidopsis*, así como seis secuencias de *ESTs*, dos de ellas de trigo, dos de cebada y otras dos de centeno. Para el diseño de los oligonucleótidos usados como cebadores reversos para la amplificación de los fragmentos F3, F6, F7 y F8, se utilizó la información proporcionada por la secuencia de los fragmentos adyacentes una vez que éstos fueron obtenidos (Figura 4.12).

Se comenzó a amplificar por el extremo 3' del gen, con un primer fragmento que se denominó F1, y se fue avanzando en dirección 5' en la amplificación de fragmentos solapantes hasta concluir la secuencia con el fragmento F8 (Figura 4.13).

Rad50

ADNc de arroz

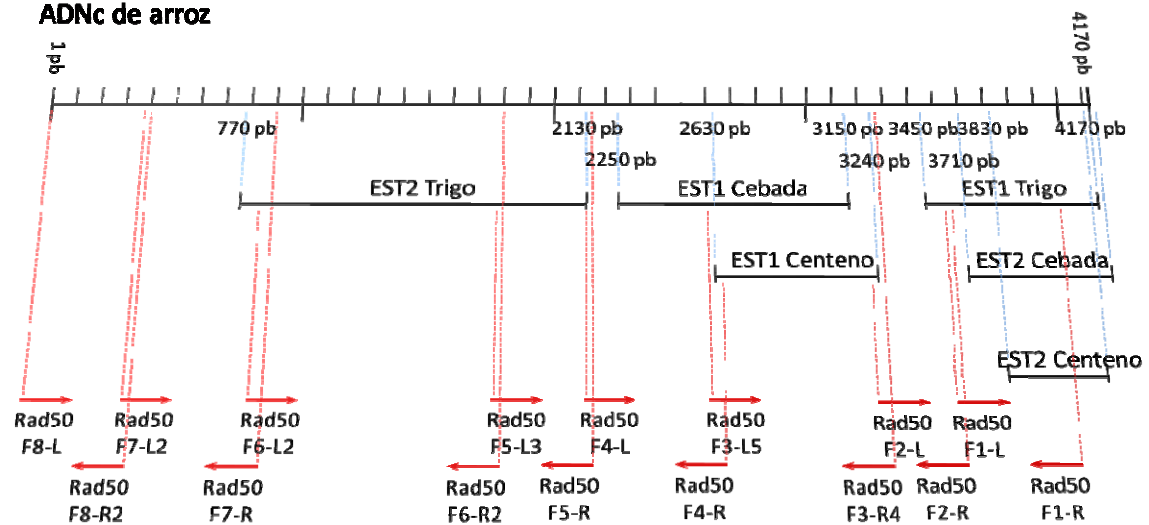


Figura 4.12. Alineamiento de la información del gen Rad50 encontrada en las bases de datos. Se tomó como base la secuencia del ADN copia de arroz (Accession No. NM_001068277) y Arabidopsis (NM_128757), y sobre éstas se alinearon seis secuencias de ESTs de trigo (TC75076 y TC134517), cebada (TC106993 y TC106474) y centeno (BE637160 y BQ160375). Sobre las regiones más conservadas se diseñaron los distintos cebadores (rojo).

Rad50

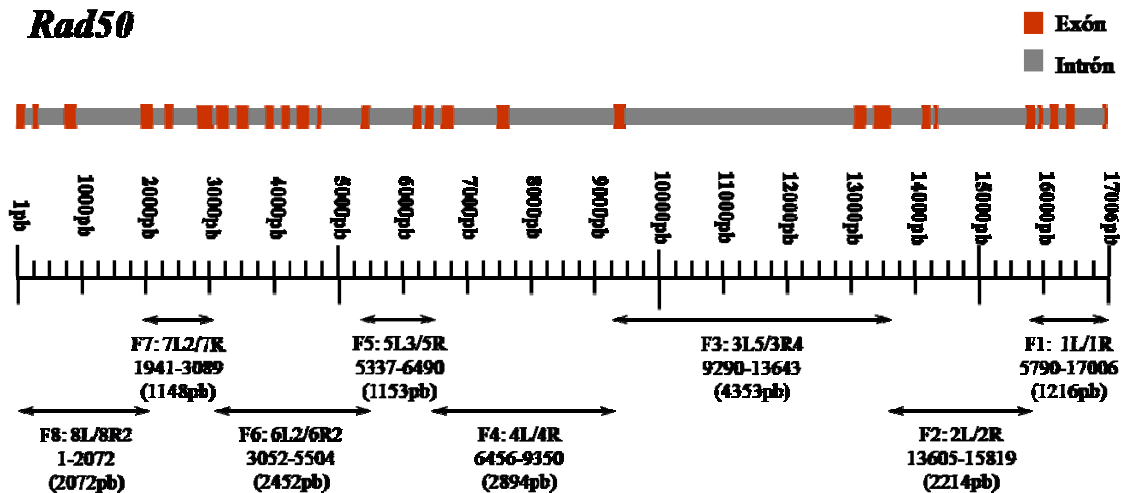


Figura 4.13. Esquema del gen Rad50. La barra de la parte superior representa la organización de los exones e intrones del gen. En la parte inferior se muestran los fragmentos en los que se dividió el gen para su amplificación y secuenciación, con los cebadores empleados en la amplificación. Los datos numéricos están referidos a *T. monococcum*.

Para la amplificación del ADN copia se emplearon los cebadores Rad50 F8-L/Rad50 F1-R, obteniéndose un fragmento de casi 4.500 pb. Las secuencias se completaron con los extremos 3' y 5' de la molécula de ADN copia mediante la técnica 5'/3' RACE.

Resultados

En la *Tabla 4.8* se recoge la información sobre los fragmentos obtenidos de los genes homeólogos *Rad50* de trigo para las secuencias genómicas. También se indican los datos obtenidos tras la secuenciación de las distintas moléculas de ADN copia. Al igual que para el gen *Mre11*, la región codificante del ADN copia tiene el mismo tamaño en todos los casos (3.951 pb), dando lugar a una proteína de 1.316 aminoácidos, y las diferencias observadas entre los distintos ADN copia se deben únicamente a sustituciones de nucleótidos.

Rad50	<i>T. monococcum</i> (A)	<i>Ae. tauschii</i> (D)	<i>T. turgidum</i> cv. Vitron (A)	<i>T. turgidum</i> cv. Vitron (B)
Fragmento F1	1.214 pb	1.255 pb	1.248 pb	1.242 pb
Fragmento F2	2.214 pb	2.217 pb	1.937 pb	2.212 pb
Fragmento F3	4.355 pb	3.865 pb	3.749 pb	4.269 pb
Fragmento F4	2.894 pb	2.904 pb	2.834 pb	2.901 pb
Fragmento F5	1.153 pb	1.152 pb	1.147 pb	1.147 pb
Fragmento F6	2.452 pb	2.454 pb	2.452 pb	2.450 pb
Fragmento F7	1.247 pb	1.247 pb	1.247 pb	1.242 pb
Fragmento F8	2.272 pb	2.171 pb	2.274 pb	2.269 pb
Gen completo	16.996 pb	16.460 pb	16.083 pb	16.932 pb
Accesion N.	EU159421	EU159422	EU159423	EU159424
ADN copia				
Exones/Intrones	27/26	27/26	27/26	27/26
ADNc codificante	3.951 pb	3.951 pb	3.951 pb	3.951 pb
5' UTR	278 pb	245 pb	257 pb	292 pb
3' UTR	280 pb	190 pb	239 pb	266 pb
ADNc + UTR	4.509 pb	4.386 pb	4.447 pb	4.509 pb
Accesion N.	EU159417	EU159418	EU159419	EU159420

Tabla 4.8 Datos obtenidos sobre la secuencia genómica y de ADN copia de *Rad50* para las distintas especies y genomas de trigo. Se indica el número de acceso con el que se encuentran en la base de datos de secuencias del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La secuencia de las proteínas RAD50 fue deducida a partir del ADN copia, y se realizó un alineamiento con todas ellas, comparándolas a su vez con las secuencias disponibles en las bases de datos de arroz y *Arabidopsis*, y también con la proteína humana y la de *S. cerevisiae*. Esta información se recoge en el *Anexo III - Alineamientos de proteínas*.

Se determinó el grado de homología entre todas ellas, siendo éste del 99% entre las proteínas procedentes de los distintos genomas de trigo, excepto para el caso de las dos proteínas RAD50A y RAD50B obtenidas a partir de la especie tetraploide que

presentaron un punto menos de homología, del 98%. Al comparar las secuencias de trigo con la de arroz se detectó una homología del 80%. Ésta fue del 64% en el caso de *Arabidopsis*. La homología con la proteína RAD50 humana es del 29-30% y de un 25% al comparar las proteínas de trigo con la de *S. cerevisiae*.

A partir de las secuencias de las proteínas con las que se realizó el alineamiento mencionado anteriormente se construyó un árbol filogenético (Figura 4.14), el cual muestra la gran homología que presentan las proteínas de trigo, en especial las expresadas a partir del genoma A de *T. monococcum* y *T. turgidum*. Éstas a su vez son muy próximas a las proteínas de arroz y *Arabidopsis*, manteniéndose más alejadas de la proteína humana y de levaduras.

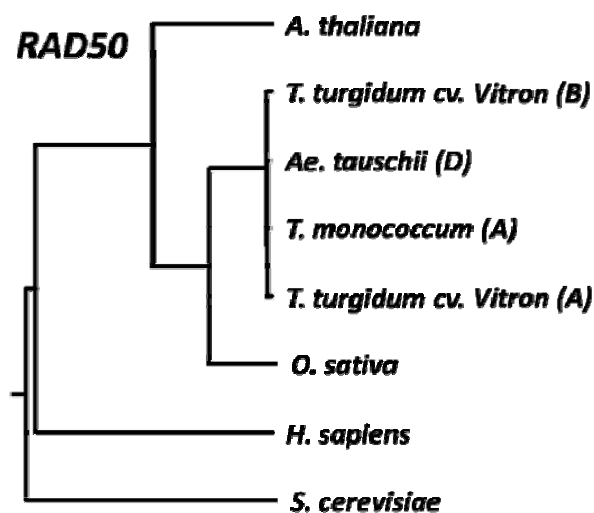


Figura 4.14 Árbol filogenético construido para las proteínas RAD50 deducidas del ADN copia de las diferentes especies de trigo, y proteínas RAD50 de otros organismos encontradas en las bases de datos.

Determinación del número de copias génicas

Las enzimas de restricción usadas en este caso fueron *Bam*HI y *Apa*I, y la sonda se marcó igualmente con digoxigenina por PCR empleando los cebadores Rad50 Sth3-L2/Rad50 Sth3-R2, obteniéndose un fragmento de 448 pb.

Al igual que en el caso del gen *Mre11* los resultados obtenidos mostraron que el gen *Rad50* está presente una sola vez por genoma, de forma que en las especies diploides apareció una única señal, mientras que en la especie tetraploide *T. turgidum* cv. 'Vitron' se detectaron dos señales de hibridación correspondientes a los genes homeólogos *Rad50A* y *Rad50B*, y en la especie hexaploide *T. aestivum* cv. 'Chinese Spring' se visualizaron tres señales pertenecientes a los tres genes homeólogos *Rad50A*, *Rad50B* y *Rad50D* (Figura 4.15).

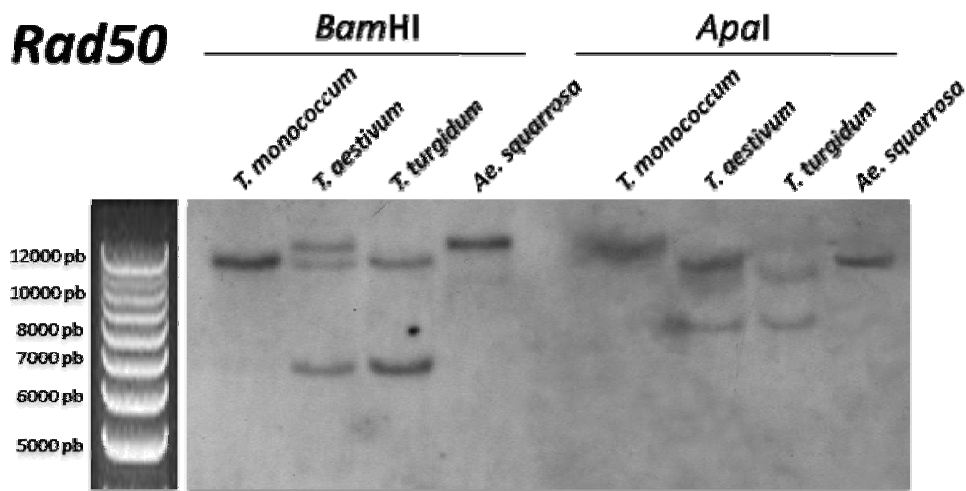


Figura 4.15 Resultados del ensayo de Southern Blot para determinar el número de copias del gen *Rad50* en las especies de trigo *T. monococcum*, *Ae. tauschii*, *T. turgidum* y *T. aestivum*.

Localización cromosómica del gen *Rad50* en el genoma de trigo

La localización cromosómica del gen *Rad50* fue determinada por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), a pesar de ser un gen de copia única, gracias a su gran tamaño. Como sonda para la hibridación se empleó toda la secuencia genómica, partiendo de los clones de cada uno de los ocho fragmentos en que se dividió el gen para su estudio. Se preparó una mezcla con los ocho fragmentos amplificados en la que la cantidad total de ADN era de 1 μ g, de forma que para cada fragmento se calculó la cantidad correspondiente a añadir en función de su tamaño para que toda la longitud del gen estuviera igualmente representada. A partir de esta mezcla de fragmentos se llevó a cabo el marcaje mediante la técnica de *nick translation*.

La localización se realizó en dos de las especies utilizadas en este estudio. Cuando las preparaciones que se hibridaron procedían de la especie *Ae. tauschii*, la sonda utilizada se obtuvo a partir de clones procedentes de esta especie, mientras que en las hibridaciones con la otra especie utilizada, *T. aestivum*, se partió de una mezcla de clones procedentes de los tres genomas presentes en esta especie. En un primer momento se trabajó con el trigo hexaploide *T. aestivum* obteniéndose señales de hibridación en el grupo de homología (GH) que, por la morfología de los cromosomas, se identificó como GH 5. Para confirmar estos datos se llevó a cabo una re-hibridación de las preparaciones con la sonda pTa794 para el gen ribosomal 5S que en el caso de esta especie se localiza en los cromosomas pertenecientes a GH 1 y GH 5 (Figura 4.16). La señal de

hibridación del gen *Rad50* aparecía únicamente en los cromosomas identificados por el gen ribosomal 5S.

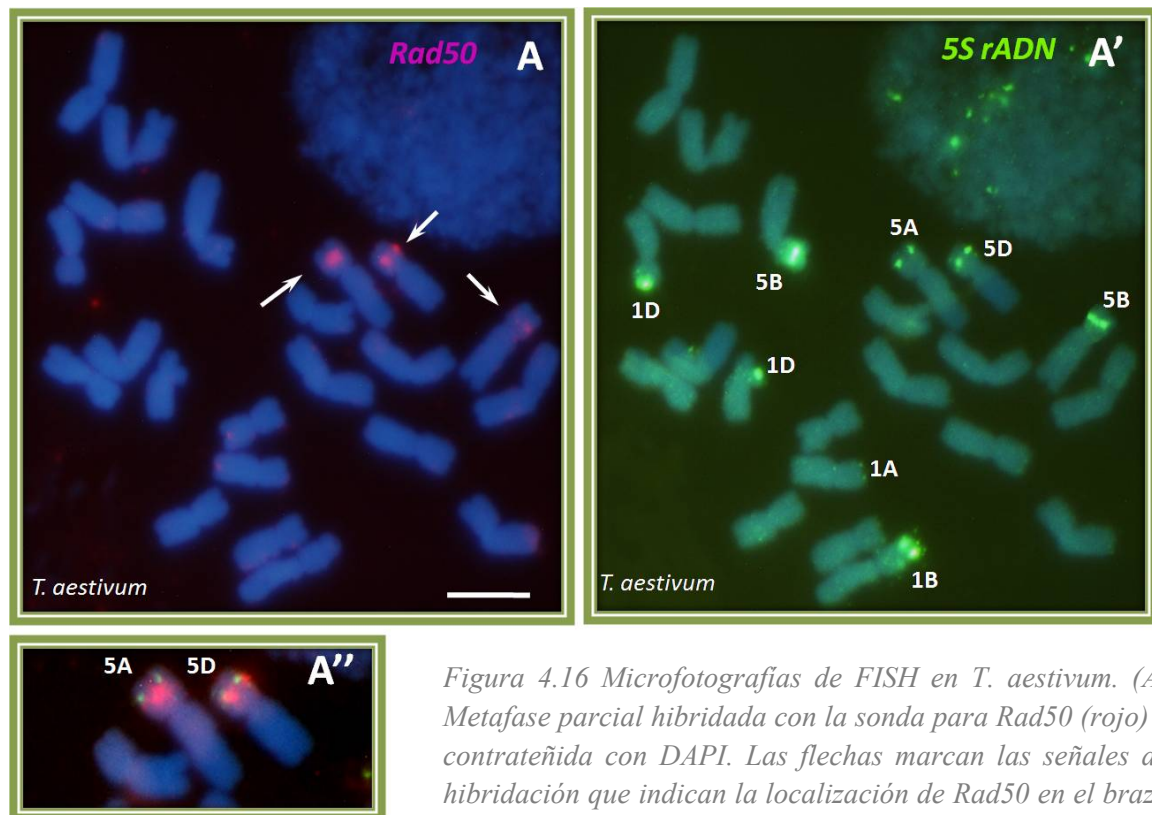


Figura 4.16 Microfotografías de FISH en *T. aestivum*. (A) Metafase parcial hibridada con la sonda para *Rad50* (rojo) y contrateñida con DAPI. Las flechas marcan las señales de hibridación que indican la localización de *Rad50* en el brazo corto de los cromosomas del GH 5 de trigo. (A') Rehibridación de la metafase anterior con la sonda pTa794 (verde) que localiza 5S ADN_r y permite la identificación de los cromosomas de los GH 1 y GH 5. La identificación de los cromosomas se llevó a cabo a partir de la morfología de los mismos así como de la intensidad de la señal observada con la sonda pTa794. (A'') Detalle de la metafase anterior con las imágenes superpuestas donde se muestra que la señal para *Rad50* se localiza en el brazo corto, justo por debajo de la señal para 5S.

Para asegurar que el gen *Rad50* se encontraba en el GH 5 se llevaron a cabo experimentos de FISH en la especie diploide *Ae. tauschii* en la cual el cromosoma 5D es el único satelizado de todo su complemento cromosómico, lo que hace especialmente sencilla la identificación de dicho cromosoma (Figura 4.17). Los ensayos de FISH con la especie *Ae. tauschii* permitieron confirmar que el gen *Rad50* se localiza en el GH 5.

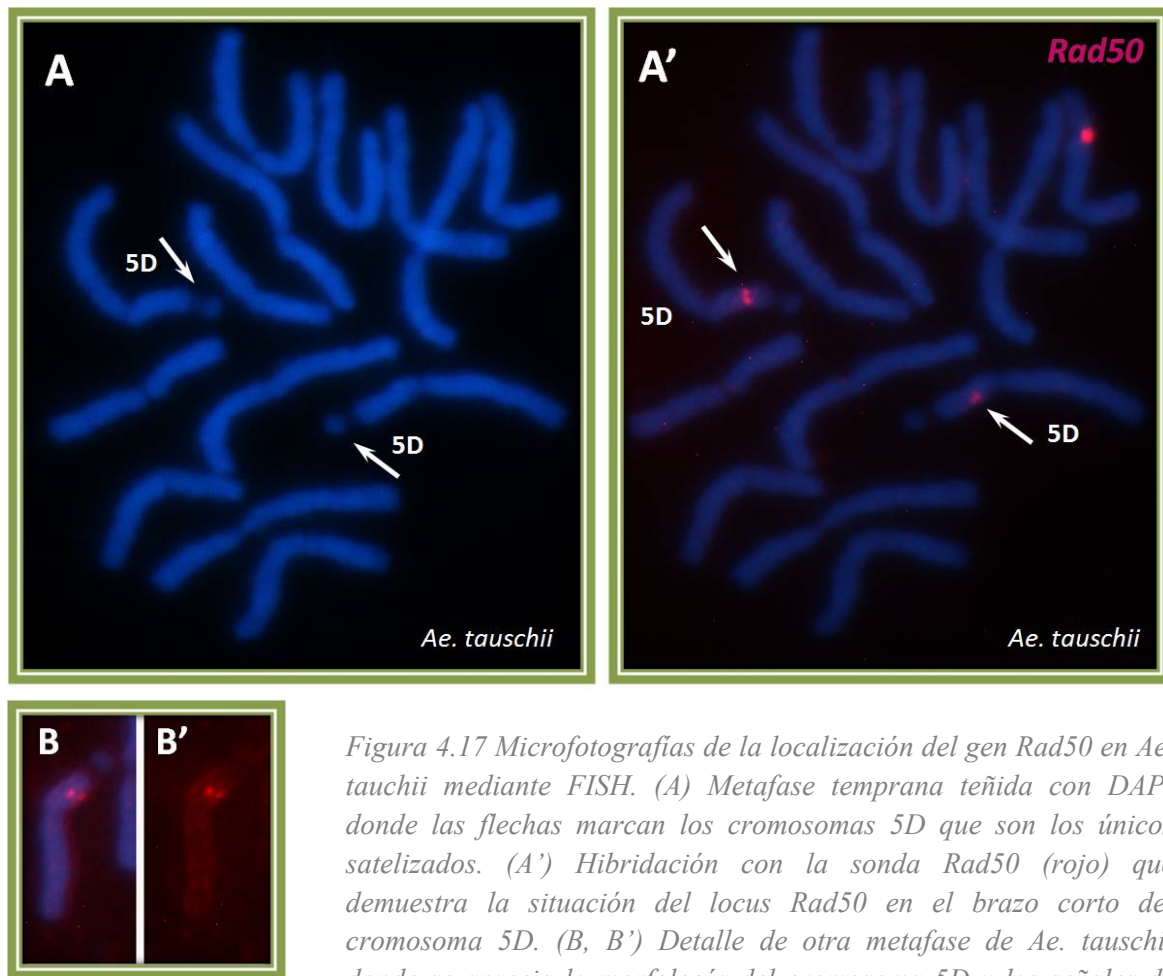


Figura 4.17 Microfotografías de la localización del gen *Rad50* en *Ae. tauschii* mediante FISH. (A) Metafase temprana teñida con DAPI donde las flechas marcan los cromosomas 5D que son los únicos satelizados. (A') Hibridación con la sonda *Rad50* (rojo) que demuestra la situación del locus *Rad50* en el brazo corto del cromosoma 5D. (B, B') Detalle de otra metafase de *Ae. tauschii* donde se aprecia la morfología del cromosoma 5D y las señales de hibridación del gen *Rad50* en ambos cromatidios.

Para confirmar la presencia del gen *Rad50* en el GH 5 de trigo se llevó a cabo un experimento de amplificación comparativa en ADN genómico de líneas aneuploides para los cromosomas implicados. Se emplearon dos líneas nulitetrasómicas de la variedad Chinese Spring, N5AT5B y N5DT5A. Para ello se diseñó una pareja de cebadores *Rad50* dif-L2/*Rad50* dif-R2 en la región del intrón 13 del gen, de forma que el fragmento amplificado mediante PCR por esta pareja de cebadores amplificaba fragmentos de diferentes tamaños para cada gen homeólogo. Mediante los resultados de la reacción de PCR en las especies diploides y tetraploide se pudo establecer una correspondencia entre las bandas que aparecían y los genes *Rad50A*, *Rad50B* y *Rad50D* de trigo, resultados que además fueron confirmados por las reacciones de PCR realizadas con las líneas nulitetrasómicas.

En la reacción de PCR realizada a partir del ADN genómico de la línea N5AT5B se encontró que la banda correspondiente a la amplificación de *Rad50A* había desaparecido, mientras que la banda asociada a *Rad50B* aparecía con mayor intensidad a

la de *Rad50D*. Para el caso de la línea N5DT5A era la banda correspondiente al genoma D la que desaparecía mientras que la de *Rad50A* aparecía con más intensidad que la de *Rad50B* (Figura 4.18). Con estos resultados se confirmó definitivamente la presencia del gen *Rad50* en el grupo de homología 5 de trigo.

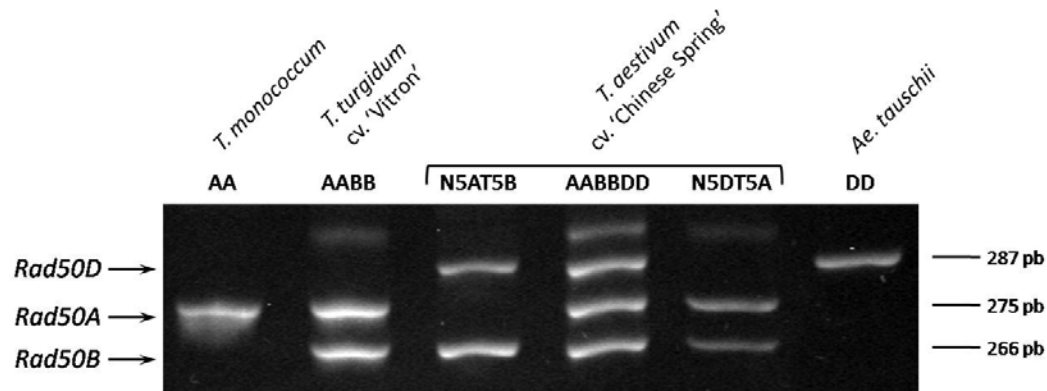


Figura 4.18 Resultados de las reacciones de PCR visualizados mediante electroforesis en gel de acrilamida al 7%, en el que se observan los fragmentos amplificados para cada una de las especies estudiadas así como para las dos líneas nulitetrasómicas. El tamaño de las bandas se estimó a través de las secuencias obtenidas previamente para el gen *Rad50* para cada una de las especies y genomas de trigo.

4.2.1.3. Caracterización del gen *Nbs1*

Caracterización molecular de *Nbs1*

La secuencia de ADN genómico de *Nbs1* fue amplificado en un único fragmento utilizando la pareja de cebadores *Nbs1*-L3/*Nbs1*-R. Estos oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la información disponible en las bases de datos de las secuencias de ADN genómico y ADN copia para el gen *Nbs1* en *Arabidopsis*, arroz y maíz. Se obtuvo así un fragmento en torno a 3.800 pb para todas las especies estudiadas.

En el caso del ADN copia éste se amplificó utilizando los mismos cebadores que en el caso anterior, y se obtuvieron fragmentos de unas 1.830 pb. En este caso no se pudo completar la secuencia de los extremos con el kit 5'/3' RACE, aunque la secuencia ya amplificada comprendía parte del extremo 5'UTR. En todos los casos la secuencia codificante de *Nbs1* tiene un tamaño de 1.725 pb, que incluyen 13 exones y 12 intrones (Figura 4.19), y dan lugar a una proteína de 574 aminoácidos.

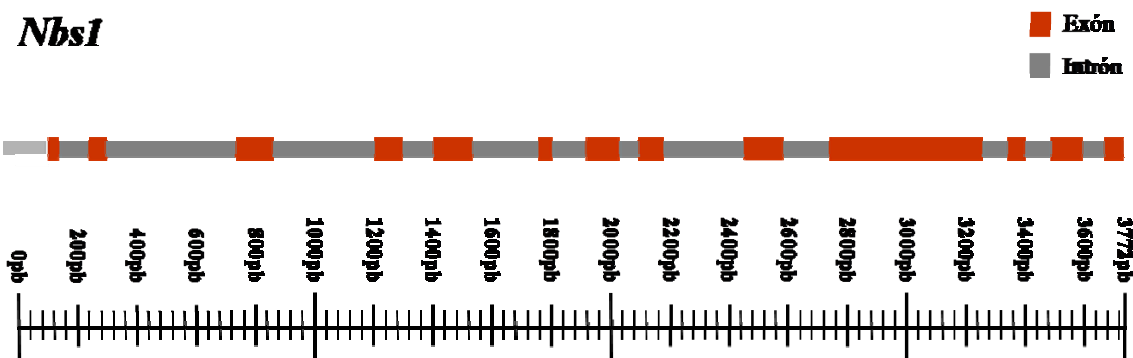


Figura 4.19 Esquema de la organización de exones e intrones del gen *Nbs1*. La barra inferior muestra la longitud total de la secuencia genómica obtenida para este gen referida a la especie *T. monococcum*.

En la Tabla 4.9 se recoge la información obtenida acerca de estas secuencias.

<i>Nbs1</i>	<i>T. monococcum</i> (A)	<i>Ae. tauschii</i> (D)	<i>T. turgidum</i> cv. Vitron (A)	<i>T. turgidum</i> cv. Vitron (B)
Gen completo	3.772 pb	3.790 pb	3.772 pb	3.799 pb
Accesion N.	EU561339	EU561341	EU561343	EU561345
ADN copia				
Exones/Intrones	13/12	13/12	13/12	13/12
ADNc amplificado	1.832 pb	1.830 pb	1.834 pb	1.842 pb
ADNc codificante	1.725 pb	1.725 pb	1.725 pb	1.725 pb
Accesion N.	EU561338	EU561340	EU561342	EU561344

Tabla 4.9 Datos obtenidos sobre las secuencias de ADN genómico y ADN copia de los distintos genes homeólogos *Nbs1* en trigo. Se indica el número de acceso con el que se encuentran en la base de datos de secuencias del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Como en los casos anteriores se dedujo la secuencia de la proteína NBS1 codificada por cada genoma a partir de la secuencia de ADN copia y se alinearon éstas con proteínas NBS1 de otras especies encontradas en el banco de datos. Esta información se encuentra en el *Anexo III – Alineamientos de proteínas*. Los alineamientos producidos fueron utilizados para construir un árbol filogenético (Figura 4.20) en el que se puede observar la gran similitud que existe entre las proteínas codificadas por los genomas de trigo, y con las proteínas de arroz y maíz, apareciendo más alejadas la proteína de levaduras y la humana.

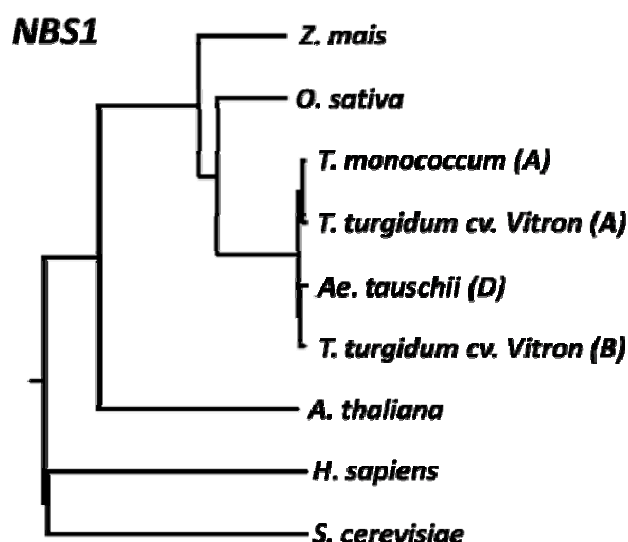


Figura 4.20 Árbol filogenético construido para las proteínas NBS1 deducidas del ADN copia de las diferentes especies de trigo, y proteínas NBS1 de otros organismos encontradas en las bases de datos.

El grado de homología de las proteínas procedentes de los distintos genomas de trigo se sitúa entre un 97-98% (Tabla 4.10), mientras que la homología de éstas con la proteína de arroz es de un 72-73%, con la de maíz es de un 68-69%, y de un 34% con la proteína de *Arabidopsis*. La homología con la proteína NBS1 humana es muy baja, de 16-17%, y tan sólo de un 9-11% con *S. cerevisiae*. Es en el caso de la proteína NBS1 en la que se encuentran las mayores diferencias en su secuencia cuando se comparan las proteínas de trigo con las de otras especies.

	<i>Z. mays</i>	<i>O. sativa</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Triticum</i> MRE11	85%	82%	68%	41%	29-31%
<i>Triticum</i> RAD50	-	80%	64%	29-30%	25%
<i>Triticum</i> NBS1	68-69%	72-73%	34%	16-17%	9-11%

Tabla 4.10 Datos sobre la homología encontrada para las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 al comparar su secuencia en trigo con las de otras especies.

Determinación del número de copias génicas

El ADN genómico de las diferentes especies se cortó con las enzimas de restricción *Bgl*I y *Sac*I. Como sonda se empleó un fragmento de 392 pb marcado con digoxigenina mediante PCR amplificado con la pareja de cebadores Nbs1 SP5/Nbs-R. Los resultados mostraron que, al igual que para los casos anteriores, el número de señales de hibridación está en relación con el número de genomas presente en cada especie por lo que el gen *Nbs1* se encuentra también en forma de copia única en trigo (Figura 4.21).

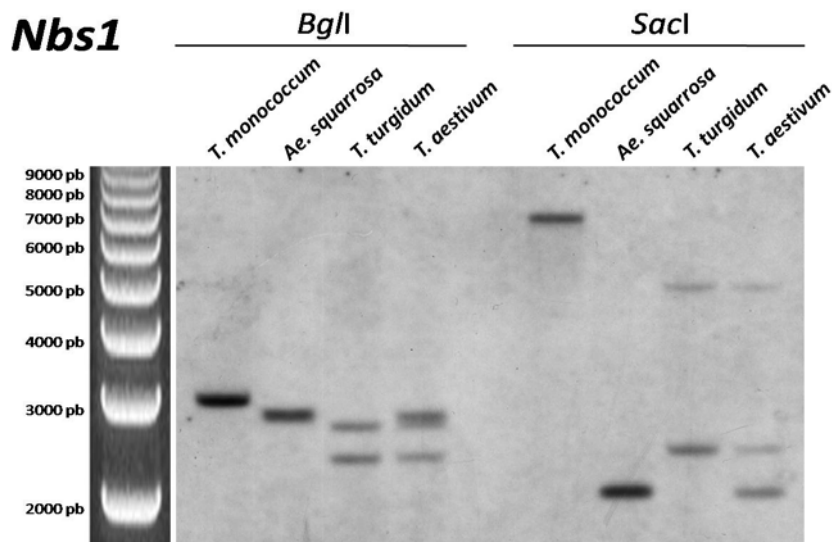


Figura 4.21 Ensayo de Southern Blot para determinar el número de copias del gen *Nbs1* en trigo. Los resultados de la hibridación muestran que se trata de un gen de copia única.

4.2.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICAS

4.2.2.1. Análisis de expresión global mediante PCR cuantitativa

Para el análisis del nivel de expresión de los genes del complejo MRN en las especies usadas en este estudio se ha utilizado la técnica de PCR cuantitativa (q-PCR). Antes de comenzar con los análisis de expresión se llevó a cabo una evaluación de varios genes candidatos a ser usados como controles internos en las reacciones. Se diseñaron cebadores para la amplificación de genes utilizados en este tipo de estudios, como el gen de la alcohol deshidrogena, el gen de la ubiquitina, el de la puroindolina-b, y el gen ribosomal *18S*, y se comprobó su expresión mediante PCR cuantitativa en las diferentes especies de trigo estudiadas. De entre todos los genes ensayados, el gen ribosomal *18S* mostró una expresión muy similar entre las diferentes especies a partir de una misma cantidad de ARN, y por ello fue el elegido como control endógeno en todos los experimentos de PCR cuantitativa.

Para los tres genes estudiados se llevaron a cabo estudios de cuantificación relativa de la expresión usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito en el trabajo de Livak y col.

(2001). El valor de C_t (*Threshold Cycle*) indica el número del ciclo de la reacción en el que la cantidad de amplicón alcanza un valor umbral fijado. El valor ΔC_t indica la diferencia entre los valores de C_t de la muestra problema y del control endógeno. Finalmente, los valores $\Delta\Delta C_t$ y $2^{-\Delta\Delta C_t}$ indican el nivel de expresión de las muestras referidas a una de ellas, generalmente la de menor expresión, que se toma como calibrador, adquiriendo ésta un valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}=1$.

Este método de cuantificación asume que la eficiencia de la amplificación es igual para el gen problema y para el control endógeno. Por ello previamente a los ensayos se comprobó la eficiencia de amplificación para los distintos genes de acuerdo con Livak y col. (2001). Para ello se realizaron una serie de reacciones para cada uno de los dos genes partiendo de diluciones seriadas del ADN copia, de forma que en cada reacción se fue reduciendo a la mitad la cantidad de ADN molde. Posteriormente, para cada dilución se calculó el valor ΔC_t y se representaron estos valores frente a la concentración. La recta que se obtiene debe tener una pendiente lo más próxima a cero, lo que significa que la eficiencia de amplificación entre ambos genes es similar.

Para cada muestra de ARN se llevaron a cabo tres reacciones independientes de retrotranscripción (RT) y el ADN copia obtenido en cada caso fue usado para realizar reacciones de PCR cuantitativa. De este modo cada muestra de ARN se analizó por triplicado. A su vez, en cada experimento de PCR cuantitativa las muestras se incluyeron por duplicado. Como material de partida se aisló el ARN total a partir de espigas inmaduras de varias plantas dentro de la misma especie con el fin de homogenizar el estado del desarrollo de las espigas utilizadas. Este material fue controlado mediante microscopía para confirmar el estado de meiosis.

También, para determinar la existencia de variaciones intra-específicas, se analizó por separado la expresión en plantas individuales para cada especie de trigo estudiada, analizando tres individuos por especie y realizando los ensayos de igual forma que en el caso anterior.

Análisis de la expresión de *Mre11*

En los ensayos de PCR cuantitativa para determinar los niveles de expresión del gen *Mre11* se empleó *SYBR Green* (Applied Biosystems) para el marcaje de los fragmentos

Resultados

amplificados, y como sistema de detección se usó el equipo *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

En primer lugar se comprobó que las eficiencias de amplificación tanto para el gen *Mre11* como para el gen ribosomal *18S*, usado como control endógeno, eran similares. Con una primera pareja de cebadores se probó para amplificar el gen *Mre11* obteniéndose diferentes eficiencias para ambos genes. Debido a ello se diseñó una segunda pareja de cebadores *Mre11* qPCR-L2/*Mre11* qPCR-R2. Para el gen *18S* se usaron los cebadores *18S* RNA-L/*18S* RNA-R. La recta que se obtuvo al representar ΔC_t frente a la concentración (Figura 4.22) tenía un pendiente de 0,16 lo que significa una eficiencia similar en la amplificación de ambos genes. Estas parejas de cebadores fueron las empleadas en el resto de ensayos para el gen *Mre11*.

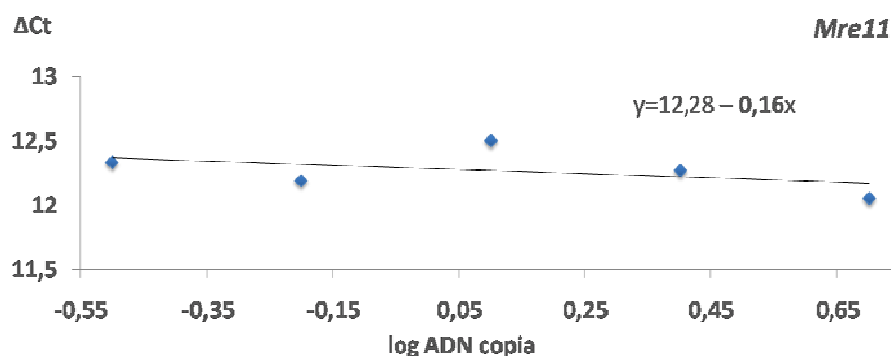


Figura 4.22 Comparación de las eficiencias de amplificación para los genes *Mre11* y *18S*. Se representa la concentración de ADN copia frente a la diferencia de los valores de C_t de ambos genes para cada concentración.

En primer lugar se analizaron las muestras obtenidas a partir del *pool* de ARN extraído de varias plantas de cada especie. En la Tabla 4.11 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de las distintas especies y el valor calculado de ΔC_t para cada una de las tres repeticiones que se hicieron.

Se analizaron estos resultados y se calcularon los valores $\Delta \Delta C_t$ y $2^{-\Delta \Delta C_t}$ para cada especie. Como calibrador se tomó la especie *Ae. tauschii* por presentar el mayor valor de ΔC_t (menor nivel de expresión), adquiriendo un valor para $\Delta \Delta C_t$ y $2^{-\Delta \Delta C_t}$ de 0 y 1, respectivamente, refiriéndose el resto de muestras al calibrador, de forma que los valores de $2^{-\Delta \Delta C_t}$ para cada especie representa el número de veces que se expresa más el gen *Mre11* en una especie dada que en el calibrador. Estos datos se muestran en la Tabla 4.12.

<i>Mre11</i>	Repetición 1			Repetición 2			Repetición 3		
	Ct <i>Mre11</i>	Ct 18S	Δ Ct	Ct <i>Mre11</i>	Ct 18S	Δ Ct	Ct <i>Mre11</i>	Ct 18S	Δ Ct
<i>T. monococcum</i>	29,88	14,55	15,33	30,58	14,99	15,59	30,64	14,76	15,88
<i>Ae. tauschii</i>	30,97	14,34	16,63	31,43	14,40	16,94	31,08	14,65	16,43
<i>T. turgidum</i>	29,98	14,37	15,61	30,79	14,68	16,11	30,28	14,24	16,04
<i>T. aestivum</i>	28,57	14,88	13,69	29,14	15,18	13,96	28,43	14,44	13,99

Tabla 4.11 Los valores de Ct que se indican para *Mre11* y 18S para cada repetición son la media de las dos réplicas realizadas de cada reacción de qPCR. Se indica el valor Δ Ct calculado restando el valor de Ct del control al valor Ct del gen *Mre11*.

<i>Mre11</i>	Avg Δ Ct \pm Sd	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
<i>Triticum monococcum</i> (AA)	15,60 \pm 0,27	-1,06	2,08
<i>Aegilops tauschii</i> (DD)	16,66 \pm 0,25	0	1
<i>Triticum turgidum</i> cv. Vitron (AABB)	15,92 \pm 0,27	-0,74	1,67
<i>T. aestivum</i> cv. Chinese Spring (AABBDD)	13,88 \pm 0,16	-2,78	6,87

Tabla 4.12 Cálculo de los valores $\Delta\Delta$ Ct y $2^{-\Delta\Delta$ Ct para las distintas especies. Se tomó como calibrador la especie *Ae. tauschii*, refiriendo el resto de especies a ésta.

Los resultados obtenidos (Figura 4.23) muestran que en la especie *T. monococcum* la expresión del gen *Mre11* es aproximadamente el doble (2,08 veces) a la detectada en el caso de la otra especie diploide *Ae. tauschii*. En el caso de la especie tetraploide *T. turgidum* cv. ‘Vitron’, la expresión es algo menor que en el caso de *T. monococcum*, y es 1,6 veces mayor que en *Ae. tauschii*. Para la especie hexaploide *T. aestivum* se detectaron los mayores niveles de expresión, siendo 6,8 veces mayor a la del calibrador.

Paralelamente, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa en los que se analizó la expresión del gen *Mre11* a nivel intra-específico, tomando como muestras de partida ARN procedente de plantas individuales, de forma que se analizaron por separado tres plantas para cada una de las especie. En la Tabla 4.13 se recogen los datos obtenidos para cada repetición, junto con el valor Δ Ct calculado.

Resultados

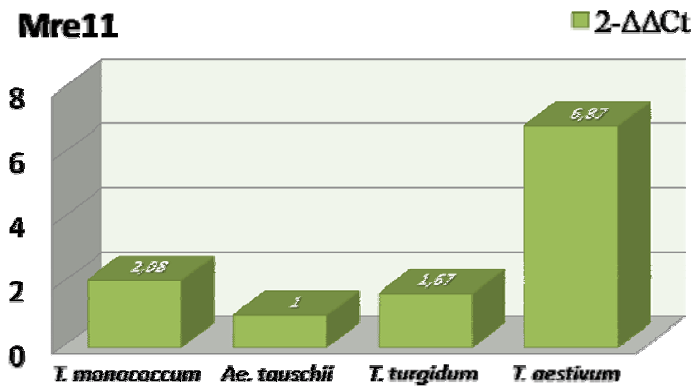


Figura 4.23 Diagrama con los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para cada especie tomando como calibrador a *Ae. tauschii*.

<i>Mre11</i>	Repetición 1			Repetición 2			Repetición 3		
	Ct <i>Mre11</i>	Ct 18S	ΔC_t	Ct <i>Mre11</i>	Ct 18S	ΔC_t	Ct <i>Mre11</i>	Ct 18S	ΔC_t
<i>T. monococcum</i>									
Indiv. 1	28,65	14,67	13,98	28,20	15,05	14,15	28,32	14,67	13,65
Indiv. 2	30,30	14,83	15,47	29,00	15,66	14,26	29,31	14,97	14,34
Indiv. 3	30,56	14,67	15,98	31,09	15,66	15,43	30,20	14,78	15,42
<i>Ae. tauschii</i>									
Indiv. 1	32,01	14,72	15,29	31,45	15,99	15,46	30,69	15,06	15,63
Indiv. 2	31,89	14,40	15,49	30,89	15,87	15,02	31,20	15,63	15,57
Indiv. 3	33,30	14,54	16,76	31,54	15,53	16,01	31,57	15,47	16,10
<i>T. turgidum</i>									
Indiv. 1	31,97	14,43	15,54	31,54	15,66	15,86	29,63	14,66	14,97
Indiv. 2	31,03	14,45	15,58	31,71	15,68	16,03	30,42	14,62	15,80
Indiv. 3	31,02	14,74	15,37	30,04	15,55	15,89	30,41	14,92	15,49
<i>T. aestivum</i>									
Indiv. 1	27,88	14,73	13,15	29,52	15,56	13,96	28,41	15,04	13,37
Indiv. 2	28,91	14,54	14,37	28,07	14,87	13,20	27,67	14,62	13,05
Indiv. 3	29,23	14,57	14,66	29,62	14,91	14,71	28,61	14,70	13,91

Tabla 4.13 Los valores de Ct que se indican para *Mre11* y *18S* para cada repetición son la media de las dos réplicas realizadas de cada reacción. También se recogen los valores de ΔC_t para cada muestra.

Se analizaron estos resultados calculándose los valores de $\Delta\Delta C_t$ y $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para cada uno de los individuos (Tabla 4.14). En este caso se tomó también como calibrador al individuo 3 de la especie *Ae. tauschii*.

En el caso de *T. monococcum* se encontró gran variabilidad entre los tres individuos analizados, con unos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ que oscilan entre 6,4 para el individuo uno y 2 para el individuo tres. En el caso de *Ae. tauschii* las variaciones encontradas entre individuos no son tan grandes, oscilando los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ entre 1 para el individuo tres (tomado como calibrador), y 2,3 para el individuo dos. Los individuos de la especie

tetraploide presentaron los valores más homogéneos situándose entre 1,7 y 2,2. Para la especie hexaploide se encontró variabilidad, presentando dos de los individuos unos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ superiores a 8, y el tercero un valor de 4,5 (Figura 4.24).

<i>Mre11</i>		Avg $\Delta Ct \pm Std\ dev$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
<i>Triticum monococcum</i>	Indiv. 1	$13,92 \pm 0,25$	-2,68	6,41
	Indiv. 2	$14,69 \pm 0,67$	-1,91	3,76
	Indiv. 3	$15,58 \pm 0,83$	-1,02	2,03
<i>Aegilops tauschii</i>	Indiv. 1	$15,79 \pm 0,60$	-0,81	1,75
	Indiv. 2	$15,36 \pm 0,29$	-1,24	2,36
	Indiv. 3	$16,60 \pm 0,53$	0	1
<i>Triticum turgidum</i>	Indiv. 1	$15,45 \pm 0,45$	-1,15	2,22
	Indiv. 2	$15,80 \pm 0,22$	-0,8	1,74
	Indiv. 3	$15,58 \pm 0,27$	-1,02	2,03
<i>Triticum aestivum</i>	Indiv. 1	$13,49 \pm 0,41$	-3,11	8,63
	Indiv. 2	$13,54 \pm 0,72$	-3,06	8,34
	Indiv. 3	$14,42 \pm 0,44$	-2,18	4,53

Tabla 4.14 Resultados obtenidos en los ensayos de PCR cuantitativa analizando tres individuos independientes para cada especie. Se recogen los valores promedio de Ct para los genes *Mre11* y 18S de las dos réplicas realizadas para cada reacción. También se indican los valores medios para cada especie calculados a partir de los tres individuos analizados.

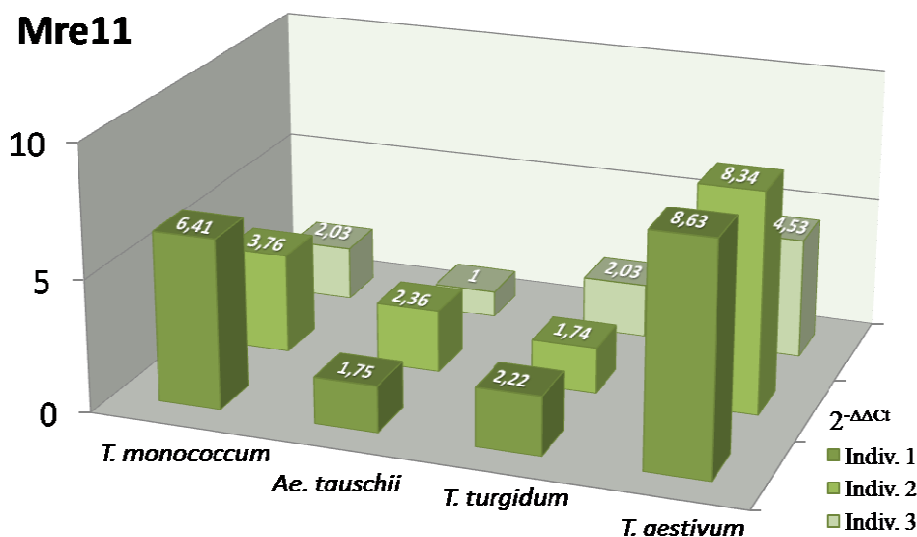


Figura 4.24 Representación de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada individuo en las distintas especies.

Análisis de la expresión de *Rad50*

En los ensayos de PCR cuantitativa para los genes *Rad50* y *Nbs1* se empleó el sistema de detección mediante sondas tipo taqman *Universal probe library* (Roche). Para el diseño

Resultados

de estos experimentos se buscaron regiones totalmente conservadas de las secuencias de ADN copia en los diferentes genomas secuenciados. Estas secuencias se introdujeron en el programa de búsqueda de sondas de la página web de la casa comercial Roche (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>) y el programa diseñó la pareja de cebadores que se debían emplear y la sonda correspondiente. Esto se realizó para los genes *Rad50* y *Nbs1*, así como para el gen ribosomal *18S* empleado como control interno.

Los cebadores empleados para la amplificación del gen *Rad50* en los ensayos de PCR cuantitativa fueron qRad-L/qRad-R y para el gen ribosomal *18S* se usaron q18s-L/q18s-R. Se usó la sonda #138 (TGGTGGAT) para el gen *Rad50*, y la sonda #131 (ACCACCAG) para el control *18S*.

La eficiencia de amplificación fue comparada para ambos genes por el método descrito anteriormente, y la pendiente obtenida tras representar los valores de ΔC_t frente a la concentración fue de -0,06, lo que indica una eficiencia muy similar en la amplificación de los genes *Rad50* y *18S* (Figura 4.25).

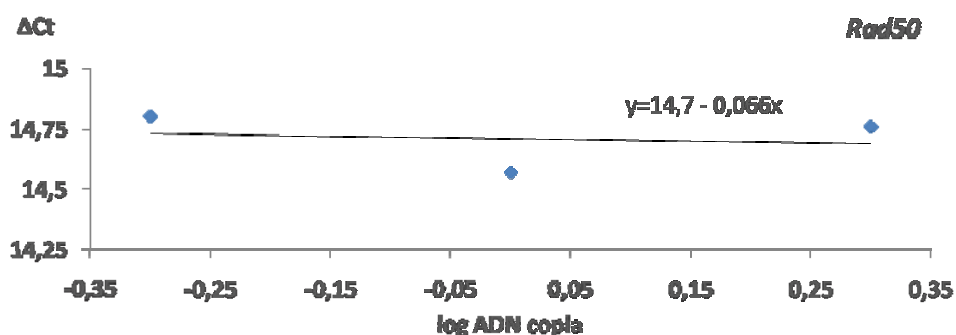


Figura 4.25 Comparación de la eficiencia de amplificación de los genes *Rad50* y *18S*. Se representa la concentración de ADN copia frente a la diferencia de los valores de C_t .

Igual que en el caso del gen *Mre11*, los análisis de expresión se llevaron a cabo con material procedente de varias plantas partiendo de un *pool* de ARN total extraído de espigas inmaduras de varios individuos para cada especie. Los resultados de los ensayos de PCR cuantitativa para este material se recogen en la Tabla 4.15 donde además se indican los valores calculados de ΔC_t .

<i>Rad50</i>	Repetición 1			Repetición 2			Repetición 3		
	Ct <i>Rad50</i>	Ct <i>18S</i>	Δ Ct	Ct <i>Rad50</i>	Ct <i>18S</i>	Δ Ct	Ct <i>Rad50</i>	Ct <i>18S</i>	Δ Ct
<i>T. monococcum</i>	31,77	14,60	17,17	31,85	14,49	17,36	31,92	14,225	17,695
<i>Ae. tauschii</i>	31,135	14,265	16,87	31,265	14,33	16,935	31,10	14,065	17,035
<i>T. turgicum</i>	31,06	14,44	16,62	31,285	14,605	16,68	30,995	14,385	16,61
<i>T. aestivum</i>	27,745	14,20	13,545	27,635	14,285	13,35	28,305	14,215	14,09

Tabla 4.15 Resultados de los análisis de expresión del gen *Rad50* para las diferentes especies de trigo. Los valores de Ct para ambos genes son los valores medios calculados a partir de las dos réplicas de cada qPCR.

A partir estos resultados se calcularon para cada especie los valores de $\Delta\Delta$ Ct y $2^{-\Delta\Delta$ Ct. Se tomó como calibrador la especie *T. monococcum* por presentar el mayor valor para Δ Ct y por consiguiente la menor expresión (Tabla 4.16).

<i>Rad50</i>	Avg Δ Ct \pm Sd	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
<i>Triticum monococcum</i> (AA)	17,41 \pm 0,26	0	1
<i>Aegilops tauschii</i> (DD)	16,93 \pm 0,08	-0,48	1,39
<i>Triticum turgidum</i> cv. ‘Vitron’ (AABB)	16,63 \pm 0,04	-0,78	1,72
<i>T. aestivum</i> cv. ‘Chinese Spring’ (AABBDD)	13,66 \pm 0,38	-3,75	13,45

Tabla 4.16 Valores de $\Delta\Delta$ Ct y $2^{-\Delta\Delta$ Ct para las diferentes especies tomando como calibrador la especie *T. monococcum*.

En la especie *Ae. tauschii* se encontraron unos niveles de expresión algo mayores, de 1,4 veces más que en el calibrador, y un poco más altos para el tetraploide *T. turgidum*, 1,7 veces mayores. La expresión en *T. aestivum* fue muy superior al resto, más de 13 veces mayor que en *T. monococcum*. En la Figura 4.26 se representa un diagrama con los valores de $2^{-\Delta\Delta$ Ct para cada especie.

Para estudiar las posibles variaciones en los niveles de expresión entre individuos dentro de cada especie, se analizaron además muestras de ARN procedentes de plantas individuales, de modo que se analizaron, al igual que en el caso de *Mre11*, los mismos tres individuos para cada especie. Los valores medios de Ct para ambos genes *Rad50* y *18S* calculados a partir de las dos réplicas de cada reacción se muestran en la Tabla 4.17. En la Tabla 4.18 se recogen los valores de $\Delta\Delta$ Ct y $2^{-\Delta\Delta$ Ct para cada individuo.

Resultados

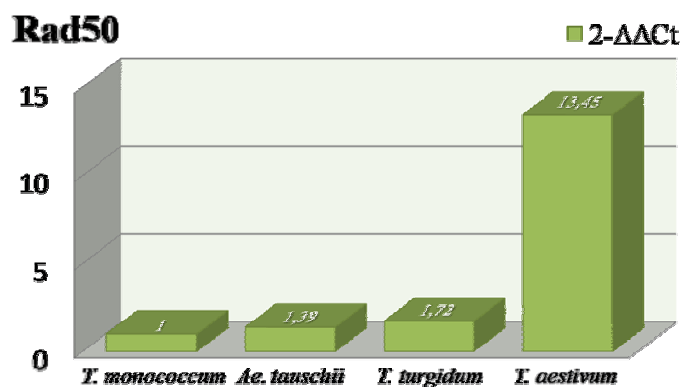


Figura 4.26 Diagrama con los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para cada especie tomando como calibrador a la especie *Triticum monococcum*.

	Rad50	Avg $\Delta C_t \pm$ Std dev	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
<i>Triticum monococcum</i>	Indiv. 1	18,81 \pm 0,23	0	1
	Indiv. 2	14,81 \pm 0,44	-4,005	16,05
	Indiv. 3	15,34 \pm 0,32	-3,47	11,08
<i>Aegilops tauschii</i>	Indiv. 1	15,72 \pm 0,22	-3,095	8,54
	Indiv. 2	14,92 \pm 0,31	-3,895	14,88
	Indiv. 3	15,79 \pm 0,05	-3,025	8,14
<i>Triticum turgidum</i>	Indiv. 1	16,37 \pm 0,34	-2,445	5,44
	Indiv. 2	17,39 \pm 0,09	-1,425	2,68
	Indiv. 3	16,41 \pm 0,19	-2,405	5,29
<i>Triticum aestivum</i>	Indiv. 1	14,69 \pm 0,24	-4,125	17,45
	Indiv. 2	13,68 \pm 0,24	-5,135	35,14
	Indiv. 3	15,71 \pm 0,19	-3,1	8,57

Tabla 4.17 Valores de C_t para el gen Rad50 y el control endógeno 18S para cada uno de los tres individuos analizados de cada especie.

Rad50	Repetición 1			Repetición 2			Repetición 3		
	Ct Rad50	Ct 18S	ΔC_t	Ct Rad50	Ct 18S	ΔC_t	Ct Rad50	Ct 18S	ΔC_t
<i>T. monococcum</i>									
Indiv. 1	34,895	15,815	19,08	32,74	14,075	18,665	33,65	14,95	18,70
Indiv. 2	30,30	15,00	15,30	28,635	14,195	14,44	29,04	14,355	14,69
Indiv. 3	30,69	15,00	15,69	29,26	14,205	15,055	29,64	14,35	15,29
<i>Ae. tauschii</i>									
Indiv. 1	31,31	15,375	15,975	30,14	14,535	15,605	30,215	14,645	15,57
Indiv. 2	30,29	15,095	15,195	29,21	14,215	14,995	28,935	14,355	14,58
Indiv. 3	31,00	15,245	15,755	30,155	14,39	15,765	30,16	14,315	15,845
<i>T. turgidum</i>									
Indiv. 1	31,68	14,92	16,76	30,33	14,215	16,115	30,555	14,33	16,225
Indiv. 2	-	-	-	38,34	21,02	17,32	39,23	21,765	17,46
Indiv. 3	32,615	16,055	16,56	31,275	15,075	16,20	31,52	15,055	16,47
<i>T. aestivum</i>									
Indiv. 1	30,13	15,165	14,965	28,805	14,26	14,545	29,15	14,595	14,555
Indiv. 2	28,88	14,935	13,945	27,59	14,13	13,46	27,905	14,27	13,635
Indiv. 3	31,025	15,12	15,905	29,87	14,34	15,53	30,07	14,36	15,71

Tabla 4.18 Valores de $\Delta\Delta C_t$ y $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculado para cada individuo analizado.

Cuando se analizó la expresión de *Rad50* en individuos se encontraron valores dispares dentro de una misma especie. La expresión más baja se encontró en el individuo uno de *T. monococcum* que se tomó como calibrador. Los otros dos individuos de esta especie mostraron una expresión mucho mayor, del orden de 11 y 16 veces mayor. Dentro de la especie *Ae. tauschii* también se encontró variabilidad en la expresión, siendo en torno a 8 veces mayor que en el calibrador en dos de los individuos estudiados, y de casi 15 veces en el tercer individuo. Los individuos tetraploides presentaron unos niveles de expresión intermedios entre los dos anteriores, de forma que dos de los individuos tenían una expresión de más de 5 veces la del calibrador, y el tercero 2,6 veces. En el caso de la especie *T. aestivum* se encontraron las mayores diferencias entre individuos. En estos individuos los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ oscilaron entre 8,5 y 35 (Figura 4.27).

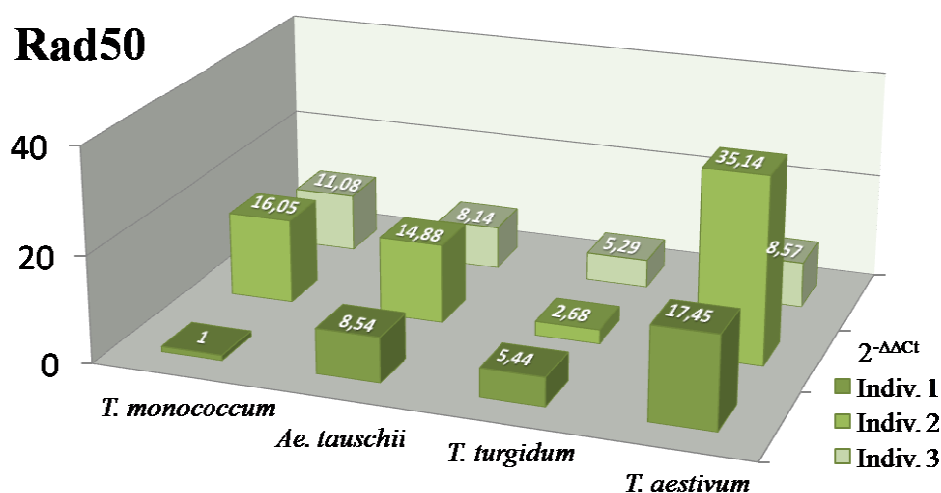


Figura 4.27 Representación de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada individuo en las distintas especies relativos al calibrador (Individuo 1 de *T. monococcum*).

Análisis de la expresión de *Nbs1*

El análisis de la expresión del gen *Nbs1* se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para el gen *Rad50*, mediante un sistema que emplea sondas tipo taqman *Universal probe library* (Roche). La sonda empleada en el caso de este gen fue la #88 (CATCCTCC) junto con los cebadores qNbs-L3/qNbs-R4. El gen usado como control endógeno fue nuevamente el *18S*, y tanto los cebadores como la sonda empleados en la reacción fueron los mismos que en el caso de los experimentos con *Rad50*.

La eficiencia de amplificación de los genes *Nbs1* y *18S* fue comparada de diferente manera a los casos anteriores. Se emplearon distintas concentraciones para

Resultados

calcular la eficiencia en cada caso, ya que tanto los valores altos de concentración para el gen *18S*, como los valores bajos para el gen *Nbs1* daban valores para Ct fuera de los límites de precisión. Por ello, al no presentar puntos comunes para poder restar los valores de Ct para ambos genes, se analizaron las eficiencias para cada gen de forma independiente, restando posteriormente las pendientes de ambas rectas para comparar así la eficiencia de amplificación de ambos genes (Figura 4.28), obteniéndose un valor de 0,0001.

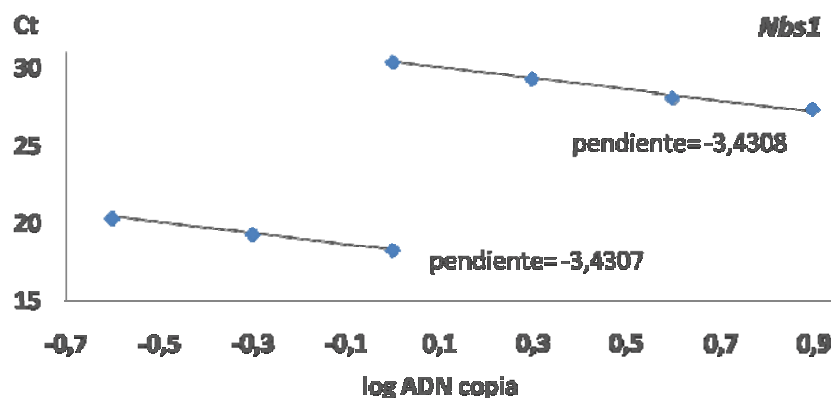


Figura 4.28 Representación de los valores de Ct para cada uno de los genes frente a la concentración de ADN copia.

De igual forma que en los casos anteriores se analizó la expresión de este gen partiendo por un lado de un *pool* de ARN obtenido a partir de varias plantas dentro de cada especie estudiada. Por otro lado, se analizaron posteriormente muestras de ARN obtenidas a partir de un solo individuo, analizándose un total de tres individuos por especie. En la Tabla 4.19 se recogen los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de mezcla de plantas.

Los valores $\Delta\Delta Ct$ y $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculados a partir de estos resultados se muestran en la Tabla 4.20, tomando como calibrador a la especie *Ae. tauschii*.

Los menores niveles de expresión se encontraron en la especie diploide *Ae. tauschii*, que fue tomada como calibrador para referir el resto de las muestras (Figura 4.29). En el caso de la otra especie diploide *T. monococcum* se encontró una expresión del orden de dos veces mayor, y unos valores similares, aunque ligeramente más altos mostró la especie tetraploide *T. turgidum*, con un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de 2,5. Nuevamente los mayores niveles de expresión, en este caso del gen *Nbs1*, los mostró *T. aestivum*, del orden de 8,6 veces mayor que en el caso del calibrador.

<i>Nbs1</i>	Repetición 1			Repetición 2			Repetición 3		
	Ct <i>Nbs1</i>	Ct 18S	Δ Ct	Ct <i>Nbs1</i>	Ct 18S	Δ Ct	Ct <i>Nbs1</i>	Ct 18S	Δ Ct
<i>T. monococcum</i>	26,582	16,532	10,049	26,477	15,351	11,126	28,382	18,293	10,088
<i>Ae. tauschii</i>	27,845	16,120	11,725	28,595	16,687	11,908	29,853	19,04	10,813
<i>T. turgidum</i>	26,980	17,01	9,97	26,904	17,021	9,883	26,939	16,427	10,512
<i>T. aestivum</i>	24,451	15,847	8,6045	26,179	18,24	7,938	25,376	16,777	8,599

Tabla 4.19 Datos de Ct obtenidos para el gen *Nbs1* y el control endógeno 18S. Los datos mostrados son la media calculada a partir de las dos réplicas de cada reacción de PCR. Se muestran también los valores calculados en cada caso de Δ Ct.

<i>Nbs1</i>	Avg Δ Ct \pm Std dev	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
<i>Triticum monococcum</i> (AA)	10,421 \pm 0,61	-1,061	2,09
<i>Aegilops tauschii</i> (DD)	11,482 \pm 0,59	0	1
<i>Triticum turgidum</i> cv. 'Vitron' (AABB)	10,12 \pm 0,34	-1,362	2,57
<i>T. aestivum</i> cv. 'Chinese Spring' (AABBDD)	8,38 \pm 0,38	-3,102	8,59

Tabla 4.20 Valores de $\Delta\Delta$ Ct y $2^{-\Delta\Delta$ Ct para las cuatro especies de trigo estudiadas. Se tomó como calibrador la especie *Ae. tauschii*.

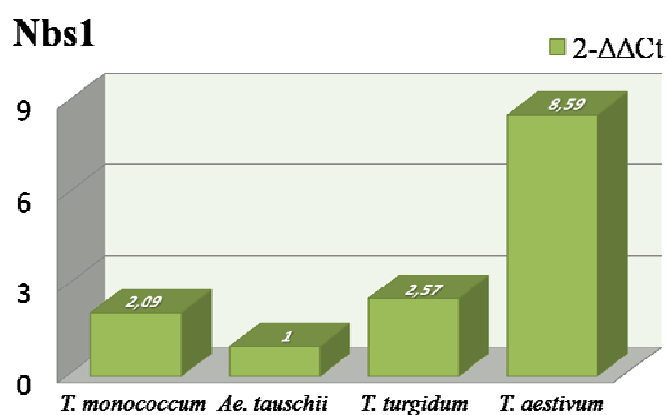


Figura 4.29 Diagrama con los valores de $2^{-\Delta\Delta$ Ct para cada especie tomando como calibrador a *Ae. tauschii*.

También fueron analizadas las muestras de ARN aislado de espigas inmaduras de un único individuo, analizándose así los tres individuos de cada especie empleados en los análisis anteriores. Los resultados obtenidos tras las reacciones de q-PCR se recogen en la Tabla 4.21.

Resultados

<i>Nbs1</i>	Repetición 1			Repetición 2			Repetición 3		
	Ct <i>Nbs1</i>	Ct 18S	ΔCt	Ct <i>Nbs1</i>	Ct 18S	ΔCt	Ct <i>Nbs1</i>	Ct 18S	ΔCt
<i>T. monococcum</i>									
Indiv. 1	30,249	16,132	14,117	30,968	18,204	12,763	30,093	16,069	14,023
Indiv. 2	28,162	16,065	12,097	28,933	16,074	12,859	28,458	16,006	12,452
Indiv. 3	28,178	15,694	12,484	28,555	15,876	12,679	26,784	15,489	11,295
<i>Ae. tauschii</i>									
Indiv. 1	31,863	16,94	14,922	32,092	17,186	14,906	31,713	17,138	14,575
Indiv. 2	31,239	16,467	14,772	31,779	16,472	15,307	30,384	16,388	13,995
Indiv. 3	33,131	17,343	15,788	33,814	17,641	16,173	32,695	17,60	15,095
<i>T. turgidum</i>									
Indiv. 1	27,938	15,805	12,133	28,397	16,048	12,348	28,234	15,959	12,275
Indiv. 3	29,301	17,134	12,167	29,586	17,193	12,393	28,538	16,707	11,83
<i>T. aestivum</i>									
Indiv. 1	27,277	16,044	11,232	27,711	16,337	11,374	27,016	15,771	11,245
Indiv. 2	30,989	16,73	14,258	31,332	16,962	14,37	29,488	16,127	13,361
Indiv. 3	30,892	16,74	14,152	31,309	17,02	14,289	-	-	-

Tabla 4.21 Valores de Ct obtenidos para cada uno de los tres individuos analizados por especie.

En la Tabla 4.22 se muestran los datos para $\Delta\Delta Ct$ y $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculados a partir de los resultados anteriores. En este caso se utilizó como calibrador el individuo 3 de *Ae. tauschii*.

<i>Nbs1</i>		Avg $\Delta Ct \pm$ Std dev	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
<i>Triticum monococcum</i>	Indiv. 1	13,63 \pm 0,76	-2,05	4,14
	Indiv. 2	12,47 \pm 0,38	-3,21	9,25
	Indiv. 3	12,15 \pm 0,75	-3,53	11,55
<i>Aegilops tauschii</i>	Indiv. 1	14,80 \pm 0,19	-0,88	1,84
	Indiv. 2	14,69 \pm 0,66	-0,99	1,99
	Indiv. 3	15,68 \pm 0,55	0	1
<i>Triticum turgidum</i>	Indiv. 1	12,25 \pm 0,11	-3,43	10,78
	Indiv. 3	12,13 \pm 0,28	-3,55	11,71
<i>Triticum aestivum</i>	Indiv. 1	11,28 \pm 0,08	-4,4	21,11
	Indiv. 2	13,99 \pm 0,55	-1,69	3,23
	Indiv. 3	14,22 \pm 0,09	-1,46	2,75

Tabla 4.22 Valores de $\Delta\Delta Ct$ y $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtenidos para cada uno de los individuos analizados tomando como calibrador el Indiv. 3 de *Ae. tauschii*.

El individuo 3 de *Ae. tauschii* mostró los menores niveles de expresión y los otros dos individuos de esta especie mostraron niveles muy similares entre ellos, con una expresión algo menor al doble que la del calibrador. En el caso de la especie *T. monococcum* se obtuvieron valores diferentes para cada uno de los individuos analizados,

con unos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que oscilaron entre 4 y 11,5. En el caso del tetraploide *T. turgidum*, debido a la degradación del ARN de uno de los individuos, solo se pudieron analizar dos individuos los cuales mostraron una expresión muy similar, en torno a 11 veces la expresión observada en el calibrador. De los tres individuos analizados en el caso de la especie hexaploide *T. aestivum*, en dos de ellos se obtuvo un valor cercano de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, concretamente de 2,7 y 3,2. Sin embargo en el tercer individuo la expresión era del orden de 21 veces mayor que para el calibrador (Figura 4.30).

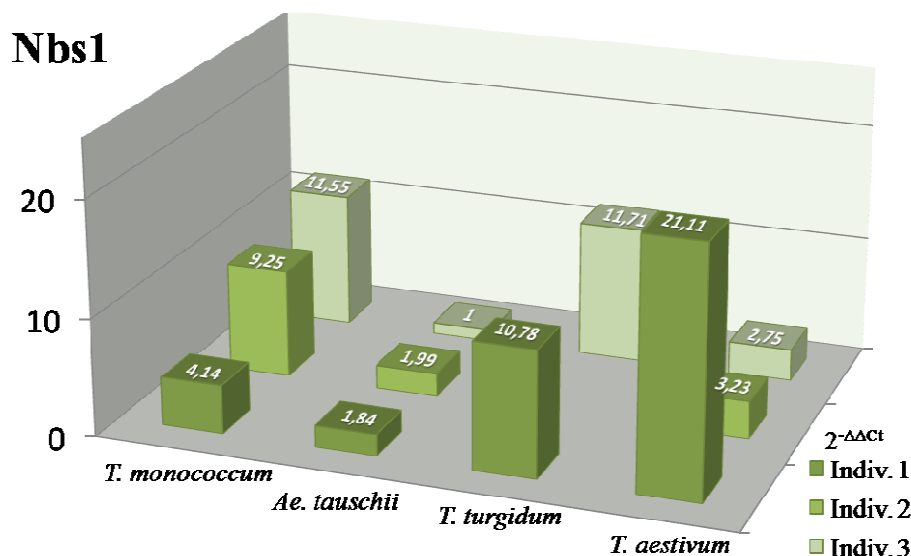


Figura 4.30 Diagrama con los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada uno de los individuos tomando como calibrador el individuo 3 de *Ae. tauschii*.

4.2.2.2. Análisis de expresión de genes homeólogos mediante SSCP

Se empleó la técnica SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*) para determinar la expresión relativa de los genes homeólogos procedentes de cada uno de los genomas de las especies poliploides de trigo, con respecto a la expresión total del gen.

Desarrollo de una técnica de SSCP modificada

La técnica empleada es una modificación de la descrita en el trabajo de Cronn y Adams, (2003). La primera de las modificaciones realizadas se refirió al método de marcaje de los fragmentos amplificados ya que a diferencia de la técnica original en la que se emplea

Resultados

radiactividad, en el presente trabajo se emplearon cebadores marcados en el extremo 5' con el fluoróforo 6-FAM. Además los fragmentos amplificados no se separaron en geles de acrilamida, sino que se empleó en su lugar un analizador genético *ABI Prism 310 genetic analyzer* (Applied Biosystems). De este modo los fragmentos se resolvieron en función de su tamaño en distintos picos, de forma que el área de estos picos está directamente relacionada con el nivel de fluorescencia del fragmento y por ello con la cantidad de fragmento amplificado.

Para llevar a cabo los estudios de expresión relativa mediante SSCP se partió de ARN total extraído de espigas inmaduras de las distintas especies de trigo. Se llevaron a cabo las reacciones de retrotranscripción, y a partir del ADN copia obtenido, se realizó una primera reacción de PCR empleando una pareja de cebadores que amplificaban una determinada región del gen. El fragmento amplificado se purificó y se usó como molde para llevar a cabo una segunda reacción de PCR, en este caso con un único cebador marcado con el fluoróforo 6-FAM. Se realizaron en todos los casos dos reacciones de marcaje, empleando el cebador directo*6FAM o reverso*6FAM, y aquel con el que mejor se resolvían los picos fue el elegido para realizar los posteriores ensayos.

En esta técnica se asume que tanto en la reacción de retrotranscripción como en las posteriores reacciones de PCR, los distintos fragmentos amplificados se encuentran en la misma proporción en que estaban en el material de partida, de forma que mediante la estimación de la proporción relativa de estos fragmentos amplificados se pudieron determinar los niveles de expresión de los genes homeólogos procedentes de cada uno de los genomas de trigo.

Ya que ésta es una técnica modificada que no se había empleado hasta el momento, se realizaron una serie de análisis para demostrar que era repetitiva y precisa. Con este fin se realizaron ensayos partiendo de ADN genómico de las especies tetraploide y hexaploide de trigo de forma que sabiendo que el gen *Mre11* es un gen de copia única, una vez llevada a cabo la amplificación de este gen a partir del ADN genómico, el área de los picos mostrados por el secuenciador debería ser del 50% del total para cada uno de los picos obtenidos a partir de *T. turgidum*, y del 33% para cada uno de los tres picos obtenidos a partir de *T. aestivum*. En este caso se empleó la pareja de cebadores Mre11 SSCP-L/Mre11 SSCP-R que amplifica un fragmento de 196 pb, de forma que dicho fragmento contiene cinco nucleótidos diferentes entre los genes homeólogos *Mre11A* y

Mre11D, seis diferencias entre *Mre11A* y *Mre11B* y siete nucleótidos diferentes entre *Mre11B* y *Mre11D*. Estos cebadores se diseñaron de forma que amplificasen una región que, siendo de pequeño tamaño, contuviese el mayor número posible de diferencias de nucleótidos entre los genes homeólogos *Mre11A*, *Mre11B* y *Mre11D*.

En los ensayos realizados en *T. turgidum* se obtuvieron dos picos con áreas que suponían un 47,6% y 52,4% del total de expresión detectada, mientras que en los realizados en *T. aestivum* se obtuvieron tres picos con áreas de 33,2%, 32,7% y 34,1%. (Figura 4.31).

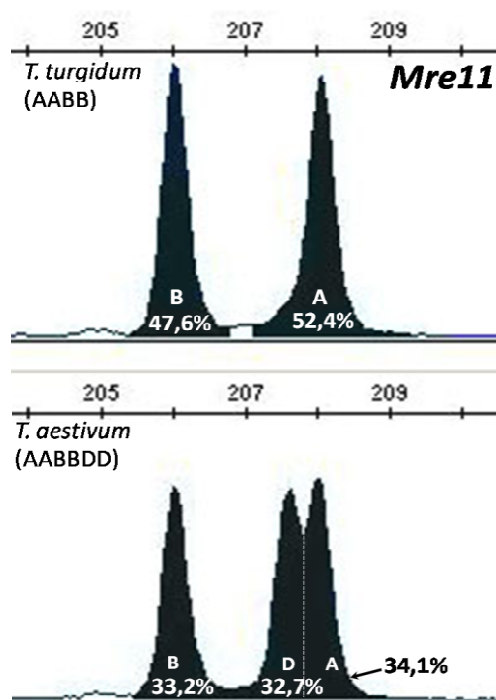


Figura 4.31 Resultados de los ensayos de SSCP realizados con muestras de ADN genómico de *T. turgidum* y *T. aestivum*. Se indica el porcentaje de fragmento amplificado procedente de los genes *Mre11A*, *Mre11B* y *Mre11D* con respecto al total. Estos fragmentos tienen todos ellos un tamaño de 196 pb. La correspondencia entre los distintos picos con los genomas A, B y D se determinó a partir de análisis de las especies diploides.

Para confirmar la precisión y fiabilidad de la técnica se trabajó con el gen *Mre11* y se diseñaron los cebadores específicos *Mre11* SSCP-L/*Mre11* SSCP-R2 que amplificaban una región de 304 pb del gen. Así, en esta región, se encontraron nueve nucleótidos diferentes entre los genomas A y B, siete diferencias entre A y D, y ocho entre los genomas B y D. Se realizaron además ensayos repetitivos donde se partía de una mezcla de ADN copia con cantidad conocida de los genes *Mre11A* y *Mre11B*. Para preparar estas mezclas, se realizaron reacciones independientes de PCR para amplificar los genes *Mre11A* y *Mre11B* a partir de los clones obtenidos en *T. turgidum*, y los fragmentos amplificados y purificados se mezclaron para preparar un total de nueve muestras con diferentes proporciones entre estos dos fragmentos: 1:100 (0,05 ng de *Mre11A* + 5 ng de

Resultados

Mre11B), 1:20 (0,25 ng de *Mre11A* + 5 ng de *Mre11B*), 1:7 (0,71 ng de *Mre11A* + 5 ng de *Mre11B*), 1:3 (1,66 ng de *Mre11A* + 5 ng de *Mre11B*), 1:1 (5 ng de *Mre11A* + 5 ng de *Mre11B*), 3:1 (5 ng de *Mre11A* + 1,66 ng de *Mre11B*), 7:1 (5 ng de *Mre11A* + 0,71 ng de *Mre11B*), 20:1 (5 ng de *Mre11A* + 0,25 ng de *Mre11B*) y 100:1 (5 ng de *Mre11A* + 0,05 ng de *Mre11B*). Cada muestra se analizó por triplicado. En la *Figura 4.32* se muestran los resultados obtenidos tras analizar los resultados proporcionados por el secuenciador para una de estas tres repeticiones.

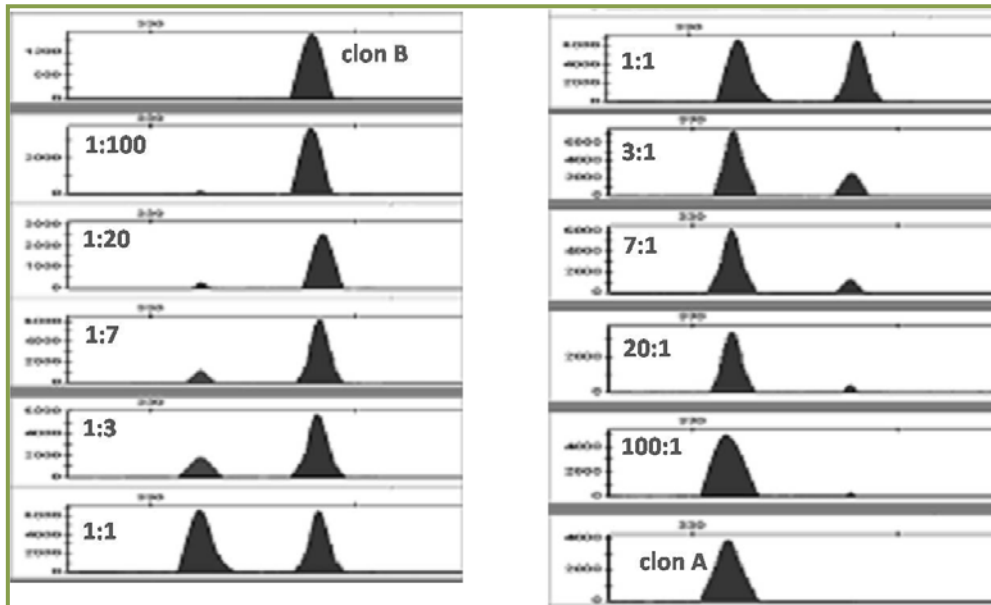


Figura 4.32 Resultados de los ensayos de SSCP para las distintas diluciones realizadas a partir de los transcritos Mre11A y Mre11B. Los picos de la izquierda de cada imagen corresponden a la amplificación a partir del genoma A y los de la derecha proceden de la amplificación a partir del genoma B.

A partir del área obtenida para cada pico se calculó la cantidad correspondiente a la expresión del gen *Mre11A* con respecto al total de expresión, este dato aparece en la *Tabla 4.23* como $A/A+B$ obtenido. También se calculó la proporción que teóricamente se esperaba en relación con la dilución realizada en cada caso ($A/A+B$ teórica), y se indica un intervalo de confianza para estos valores con un error del 5%. En todos los casos el valor obtenido se encontró dentro de este intervalo de confianza lo que confirma la alta precisión de la técnica, con excepción de la dilución 1:7, donde el valor teórico quedaría ligeramente por encima del intervalo establecido. Los escasos valores de desviación estándar obtenidos de las tres réplicas realizadas indicaron también un alto grado de repetitividad de la técnica.

Dilución A:B	A/A+B teórica	A/A+B obtenida(\pm Sd)	I.C. (95%)
1:100	0,010	0,016 \pm 0,010	-0,010 - 0,042
1:20	0,048	0,030 \pm 0,014	0,006 - 0,067
1:7	0,125	0,112 \pm 0,004	0,101 - 0,124
1:3	0,250	0,237 \pm 0,008	0,215 - 0,259
1:1	0,500	0,492 \pm 0,008	0,471 - 0,514
3:1	0,750	0,755 \pm 0,004	0,743 - 0,766
7:1	0,875	0,875 \pm 0,002	0,869 - 0,881
20:1	0,952	0,952 \pm 0,001	0,949 - 0,956
100:1	0,990	0,987 \pm 0,003	0,979 - 0,996

Tabla 4.23 Resultados del análisis por SSCP de los transcritos de los genes *Mre11A* y *Mre11B* para las nueve diluciones probadas. Se indican los valores de expresión de *Mre11A* con respecto al total, así como los valores teóricos esperados. Se indica también el intervalo de confianza para estos valores con un error del 5%.

Análisis de la expresión del gen *Mre11* mediante SSCP

Una vez confirmada la eficiencia de la técnica de SSCP modificada, se analizó la expresión de los genes homeólogos *Mre11* procedentes de los genomas A y B en la especie *T. turgidum* (AABB), así como la expresión a partir de los genomas A, B y D en *T. aestivum* (AABBDD). También se analizaron las especies diploides *T. monococcum* y *Ae. tauschii* con el fin de poder relacionar los picos obtenidos tras el análisis con los correspondientes genomas.

Para ello, se partió de muestras de ADN copia para cada una de las cuatro especies a estudiar y se realizó una primera reacción de PCR con la pareja de cebadores *Mre11* SSCP-L/*Mre11* SSCP-R2. Los fragmentos obtenidos se purificaron y cuantificaron, y se usaron como molde para llevar a cabo una segunda reacción en la que usó el cebador marcado *Mre11* SSCP-L*6-FAM. Todas las muestras se analizaron por triplicado, llevando a cabo para cada una reacciones independientes de retrotranscripción y de PCR. En la Figura 4.33 se muestran los resultados para una de estas réplicas.

Mediante los ensayos realizados en las especies diploides *T. monococcum* y *Ae. tauschii* se identificaron los picos correspondientes a la expresión de los genes *Mre11A* y *Mre11D*, respectivamente. El tercer pico en la especie hexaploide corresponde por tanto al gen *Mre11B*. Los datos sobre la expresión relativa de los genes homeólogos *Mre11* para las especies poliploides obtenidos en las tres replicas se recogen en la Tabla 4.24.

Resultados

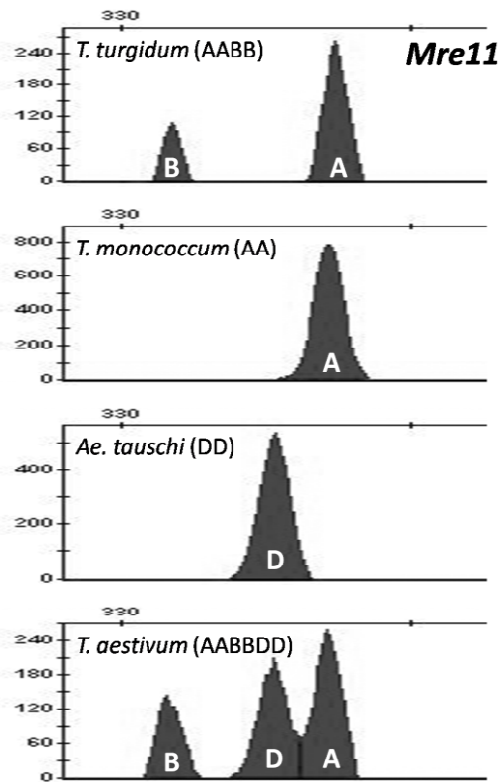


Figura 4.33 Niveles de expresión de los genes homeólogos *Mre11* en las diferentes especies de trigo estudiadas.

<i>Mre11</i>	Réplica I			Réplica II			Réplica III		
	A	B	D	A	B	D	A	B	D
<i>T. turgidum</i>	69,9%	30,1%	-	69,6%	30,4%	-	68,5%	31,5%	-
<i>T. aestivum</i>	41,9%	19,8%	38,3%	41,6%	18,6%	39,7%	42,8%	16,2%	40,8%

Tabla 4.24 Análisis por SSCP con fluorescencia en las especies *T. turgidum* y *T. aestivum*. Se indica el porcentaje correspondiente a la expresión de cada uno de los genes homeólogos *Mre11* para las tres réplicas realizadas para cada muestra.

En la Tabla 4.25 se indica el valor medio calculado a partir de las tres repeticiones realizadas para cada una. Los resultados muestran que en ambas especies el gen homeólogo *Mre11B* es el que menor niveles de expresión presenta, con un valor del 30% en *T. turgidum*, y del 18% en *T. aestivum*. Para *T. aestivum*, la expresión de los genes homeólogos *Mre11A* y *Mre11D* es muy similar, siendo algo superior para *Mre11A*, de 42%, frente a un 39% de *Mre11D*.

Para determinar la existencia de variaciones intra-específicas en la expresión de los genes homeólogos se analizaron muestras de tres individuos por separado para cada

una de las dos especies poliploides. Los resultados obtenidos para los individuos en cada una de las tres réplicas se muestran en la *Tabla 4.26*.

	<i>Mre11A</i>	<i>Mre11B</i>	<i>Mre11D</i>
<i>T. turgidum</i> (AABB)	69,4% \pm 0,7	30,6% \pm 0,7	-
<i>T. aestivum</i> (AABBDD)	42,1% \pm 0,6	18,2% \pm 1,8	39,6% \pm 1,2

Tabla 4.25 Resultados de los análisis de expresión de los genes Mre11 homeólogos para las especies de trigo T. turgidum y T. aestivum. Se muestran los valores medios calculados a partir de las tres repeticiones realizadas.

<i>Mre11</i>	Réplica I			Réplica II			Réplica III		
	A	B	D	A	B	D	A	B	D
<i>T. turgidum</i>									
Indiv. 1	68,6%	31,4%	-	71,1%	28,9%	-	74,5%	25,5%	-
Indiv. 2	56,1%	43,9%	-	58,0%	42,0%	-	57,7%	42,3%	-
Indiv. 3	55,4%	44,6%	-	54,5%	45,5%	-	50,8%	49,2%	-
<i>T. aestivum</i>									
Indiv. 1	38,7%	25,8%	35,5%	36,1%	29,3%	34,6%	41,1%	27,7%	31,2%
Indiv. 2	38,0%	21,8%	40,2%	36,8%	21,9%	41,3%	37,4%	24,1%	38,5%
Indiv. 3	37,7%	27,8%	34,5%	41,9%	22,3%	35,8%	37,7%	26,6%	35,7%

Tabla 4.26 Análisis por SSCP con fluorescencia de tres individuos en las especies T. turgidum y T. aestivum. Se indica el porcentaje correspondiente a la expresión de cada uno de los genes homeólogos Mre11 para las tres réplicas realizadas para cada muestra.

Cuando se analizaron por separado las muestras de los tres individuos de *T. turgidum* se encontró una variación entre ellos, aunque en todos los casos la expresión observada para el gen *Mre11A* era mayor que la del gen *Mre11B*. Mientras que en el individuo 1 los valores de expresión eran muy similares a los encontrados al analizar la muestra del *pool* de ARN, en los casos de los individuos 2 y 3 se encontraron valores de expresión más semejantes para ambos genes homeólogos, aunque siempre predomina la expresión del gen *Mre11A*. En la especie *T. aestivum* los valores de expresión encontrados en los distintos individuos analizados eran mucho más homogéneos entre todos ellos y a su vez similares a los valores obtenidos al analizar la muestra del *pool* de ARN. Mientras que los genes *Mre11A* y *Mre11D* tienen unos valores de expresión similares entre ellos, siendo generalmente la expresión de *Mre11A* algo mayor, la expresión del gen *Mre11B* es mucho menor que en los casos anteriores (*Tabla 4.27*).

Resultados

<i>Mre11</i>	Media de la expresión de los genes \pm desviación estándar		
	<i>Mre11A</i>	<i>Mre11B</i>	<i>Mre11D</i>
<i>Triticum turgidum</i>			
Indiv. 1	71,4 \pm 2,9	28,6 \pm 2,9	-
Indiv. 2	57,3 \pm 1,0	42,7 \pm 1,0	-
Indiv. 3	53,6 \pm 2,4	46,4 \pm 2,4	-
<i>Triticum aestivum</i>			
Indiv. 1	38,6 \pm 2,5	27,6 \pm 1,7	33,8 \pm 2,3
Indiv. 2	37,4 \pm 0,6	22,6 \pm 1,3	40,0 \pm 1,4
Indiv. 3	39,1 \pm 2,4	25,6 \pm 2,9	35,3 \pm 0,7

Tabla 4.27 Valores medios para cada uno de los individuos analizados calculados a partir de las tres réplicas realizadas de cada uno.

Análisis de la expresión del gen *Rad50* mediante SSCP

Los estudios de expresión del gen *Rad50* se han realizado partiendo únicamente de un *pool* de ARN procedente de varios individuos para cada especie, no habiendo analizado hasta el momento la expresión en individuos aislados. La primera reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores SSCP *Rad50-L*/SSCP *Rad50-R5*, amplificando parte del último exón del gen y parte de la región 3' UTR, con lo que a diferencia de los ensayos con *Mre11*, en este caso los fragmentos amplificados presentaron, además de diferencias en su secuencia de nucleótidos distinto tamaño. A partir de los genes *Rad50B* y *Rad50D* se amplificó un fragmento de 347 pb, mientras que fue de 343 pb cuando se amplificó a partir de *Rad50A*. Estos fragmentos presentaron diferencias en su secuencia, con 14 pb diferentes entre *Rad50A* y *Rad50B*, 14 pb entre *Rad50A* y *Rad50D*, y 7 pb entre *Rad50B* y *Rad50D*. La segunda reacción de PCR se llevó a cabo con el cebador SSCP *Rad50-L*6FAM*, y se realizaron igualmente tres réplicas para cada muestra analizada. En la Figura 4.34 se muestra el resultado de una de estas réplicas.

Los resultados obtenidos para las tres réplicas realizadas fueron muy similares entre sí (Tabla 4.28).

En la Tabla 4.29 se indican los valores medios de expresión de los distintos genes *Rad50*. En ambos casos, tanto para *T. turgidum* como *T. aestivum*, la expresión de los genes homeólogos es similar en todas las repeticiones realizadas. Para la especie tetraploide, el valor medio de expresión para *Rad50A* es de 53% y del 47% para *Rad50B*.

En el caso de la especie hexaploide, la expresión de *Rad50A* es de 38,4%, del 31,2% para *Rad50B*, y para *Rad50D* del 30,3%.

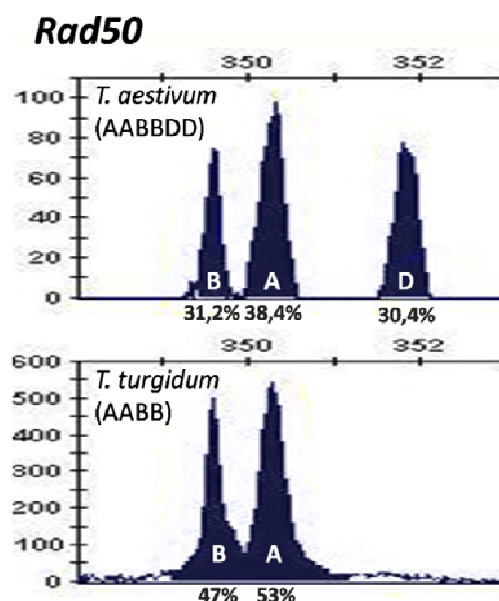


Figura 4.34 Resultado obtenido por el analizador genético para una de las repeticiones. La asignación de los genomas se llevó a cabo al analizar muestras de las especies diploides, y también los clones de ADN copia obtenidos para cada genoma.

<i>Rad50</i>	Réplica I			Réplica II			Réplica III		
	A	B	D	A	B	D	A	B	D
<i>T. turgidum</i>	54,4%	45,6%	-	49%	51%	-	55,5%	44,5%	-
<i>T. aestivum</i>	39,5%	31,8%	28,7%	39,1%	32,3%	28,5%	36,6%	29,6%	33,7%

Tabla 4.28 Análisis por SSCP con fluorescencia en las especies *T. turgidum* y *T. aestivum*. Se indica el porcentaje correspondiente a la expresión de cada uno de los genes homeólogos *Rad50* para las tres réplicas realizadas para cada muestra.

	<i>Rad50A</i>	<i>Rad50B</i>	<i>Rad50D</i>
<i>T. turgidum</i> (AABB)	53% ± 3,5	47 ± 3,5	-
<i>T. aestivum</i> (AABBDD)	38,4% ± 1,6	31,2% ± 1,4	30,4% ± 3

Tabla 4.29 Resultados de los análisis de expresión de los genes *Rad50* homeólogos para las especies de trigo *T. turgidum* y *T. aestivum*.

Análisis de la expresión del gen *Nbs1* mediante SSCP

Por último se procedió al análisis de la expresión de los genes homeólogos *Nbs1* en trigo mediante SSCP con fluorescencia.

Se han empleado los cebadores SSCP *Nbs*-L3/SSCP *Nbs*-R3 que permiten amplificar el mismo fragmento tanto a partir de ADN copia como de genómico. Esta

Resultados

región amplificada comprende parte de la región 5'UTR del gen así como del primer exón, de forma que al igual que en los ensayos en el gen *Rad50*, los fragmentos amplificados presentan diferencias en su tamaño además de diferencias en la secuencia de nucleótidos, que son debidas a una secuencia microsatélite de tipo AG que se encuentra por delante del codón de inicio. Así el fragmento amplificado para *Nbs1A* es de 138 pb, de 146 pb para *Nbs1B* y de 134 pb para *Nbs1D*, y además hay cuatro nucleótidos diferentes entre *Nbs1A* y *Nbs1D*, tres entre *Nbs1A* y *Nbs1B* y siete entre *Nbs1B* y *Nbs1D*.

Empleando esta pareja de cebadores se procedió al análisis en primer lugar de muestras de ADN genómico de las especies poliploides, para comprobar el funcionamiento de los cebadores elegidos (Figura 4.35).

Los resultados muestran que la pareja de cebadores empleada permite la amplificación de los tres genes homeólogos, los cuales se pueden resolver por separado tras su análisis en el secuenciador. Sin embargo, la eficiencia de amplificación en el caso de *T. aestivum* no es igual para los tres genes, ya que el resultado esperado sería de tres picos con áreas en torno a un 33% cada una, mientras que los resultados obtenidos muestran una amplificación mayor para *Nbs1D* y menor para *Nbs1A*. No obstante, los resultados en el caso de *T. turgidum* sí se ajustan a los esperados, situándose los valores de amplificación en ambos casos próximos al 50%.

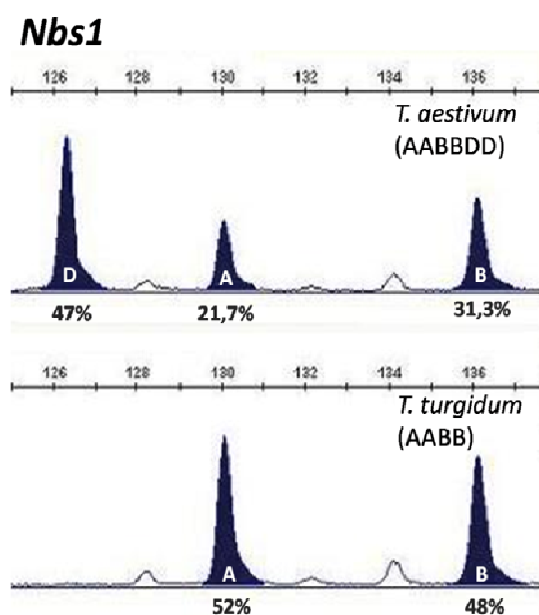


Figura 4.35 Resultados del análisis de ADN genómico para el gen *Nbs1* en las especies *T. aestivum* y *T. turgidum*. La correspondencia entre los picos obtenidos y los genomas se realizó empleando las especies diploides, coincidiendo además el orden de los picos con los tamaños esperados para cada genoma.

A falta del diseño de nuevos cebadores que permitan una amplificación similar en el ADN genómico de la especie *T. aestivum*, se ha realizado un primer ensayo preliminar de expresión de *Nbs1* en *T. turgidum* y *T. aestivum*, (Figura 4.36).

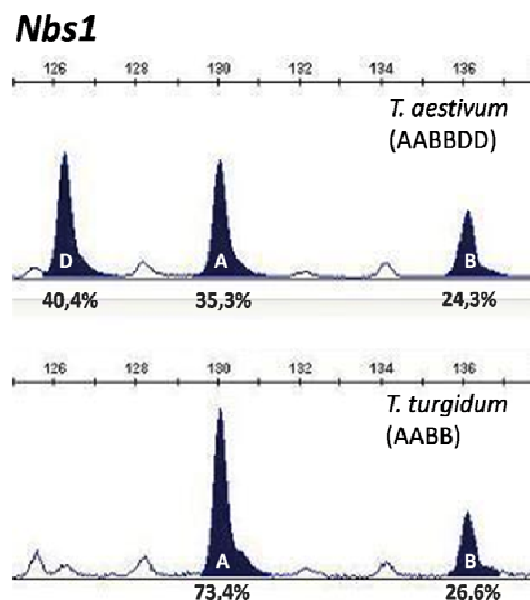


Figura 4.36 Análisis de expresión de los homeólogos *Nbs1* en *T. aestivum* y *T. turgidum*.

Para la especie tetraploide *T. turgidum*, los resultados muestran una expresión reducida del gen *Nbs1B*, expresándose *Nbs1A* del orden de tres veces más que el primero. En el caso de *T. aestivum*, los resultados obtenidos no son concluyentes ya que la pareja de cebadores empleada no permite el análisis de la expresión de *Nbs1* en *T. aestivum*, aunque también parece existir una expresión menor del gen *Nbs1B*.

4.2.3. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

Mediante los ensayos de doble híbrido se pretendía detectar la interacción entre las proteínas MRE11-RAD50, MRE11-NBS1, RAD50-NBS1; así como la formación de homodímeros MRE11-MRE11 y RAD50-RAD50. Además, y aunque no se había descrito previamente la formación de homodímeros en la proteína NBS1, también se realizaron ensayos que permitirían detectar este tipo de interacciones NBS1-NBS1. A la vez, otro de los objetivos era determinar si, a la hora de formar el complejo MRN, se producen interacciones cruzadas entre proteínas expresadas a partir de genes homeólogos de distintos genomas o, si por el contrario, existe una especificidad de genoma de modo que los complejos se formarían sólo entre proteínas codificadas por el mismo genoma.

Resultados

El primer paso consistió en clonar los ADN copia de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1* en los vectores de expresión pGilda y pB42AD. Para ello se partió de los clones de ADN copia obtenidos anteriormente para todos los genomas estudiados, y a partir de éstos se amplificó con cebadores específicos que incorporaban dianas para diferentes enzimas de restricción. Tras el uso de estas enzimas, los fragmentos producidos se clonaron en los plásmidos pGilda y pB42AD y los clones obtenidos se secuenciaron para asegurar que la secuencia a expresar había quedado en el marco de lectura adecuado.

Se llevaron a cabo dos ensayos diferentes para comprobar la interacción entre las proteínas estudiadas. En primer lugar se realizó un ensayo de crecimiento en el que se prueba la expresión del gen delator *LEU2*, de forma que un resultado positivo en este ensayo indica expresión de dicho gen, lo cual es debido a una interacción entre las proteínas híbridas. El segundo ensayo realizado es un ensayo en filtro de la β -galactosidasa, que pone de manifiesto la expresión del gen delator *lacZ*.

Se realizaron además controles de toxicidad y de autoactivación. En el control de toxicidad se comprueba que las proteínas híbridas expresadas no resultan tóxicas para el crecimiento de la levadura, mientras que en el control de autoactivación se descarta que una proteína híbrida por sí sola sea capaz de activar el sistema de expresión de los genes delatores, sin necesidad de la proximidad entre el dominio de unión a ADN y el dominio de activación de la transcripción.

Tanto los ensayos de interacción como los controles se llevaron a cabo por triplicado, realizando tanto las transformaciones de las levaduras como el revelado de las diferentes pruebas de forma independiente.

Interacciones MRE11-RAD50

En primer lugar se realizó el control de autoactivación en el cual se transforman las levaduras con un único vector recombinante y a partir de estas levaduras transformadas se realizan los ensayos de interacción previamente descritos. Se deben probar todas las construcciones a usar en los ensayos de interacción. En el presente estudio se trabajó con dieciséis construcciones diferentes ninguna de las cuales mostró indicios de autoactivación.

Paralelos a los ensayos de interacción se realizó el control de toxicidad, al igual que en el caso anterior para cada una de las construcciones empleadas, así como para todas las combinaciones probadas en las interacciones. Ninguna de las proteínas híbridas resultó tóxica para las células.

En cuanto a los ensayos de interacción se probaron dieciséis interacciones entre las diferentes proteínas MRE11 y RAD50, y además estas interacciones se probaron en las dos direcciones, de forma que el total de ensayos realizados fue de treinta y dos. Para cada interacción probada se analizaron nueve colonias de levaduras mediante el test de la β -galactosidasa, elegidas al azar entre todas las células co-transformadas. Tanto en el test de crecimiento como en el test en filtro de la β -galactosidasa se encontraron los mismos resultados, independientemente de la dirección de la interacción, y en todos los casos indicaban interacción entre las proteínas expresadas, sin detectarse ningún tipo de especificidad de proteínas expresadas por genes del mismo genoma, de forma que todas las proteínas MRE11 interaccionaban con todas las proteínas RAD50 de trigo, independientemente del genoma del cual procedieran (*Figura 4.37*).

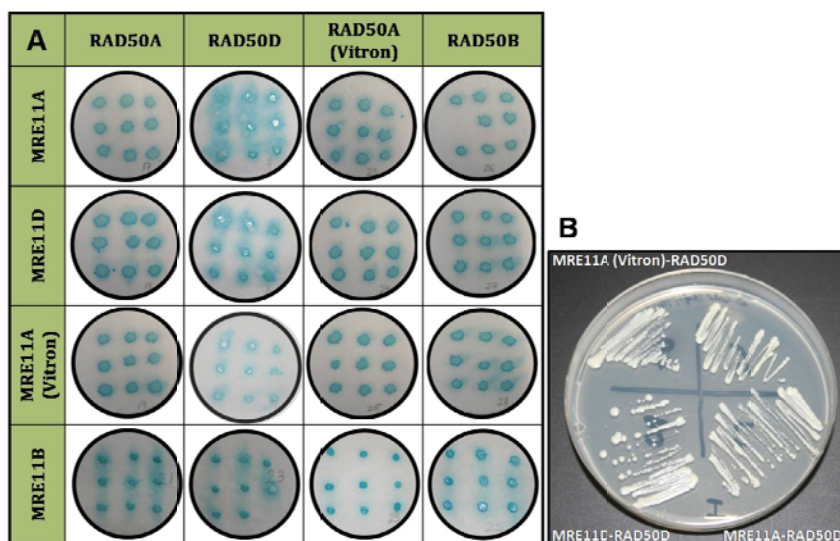


Figura 4.37 (A) Ensayo en filtro de la β -galactosidasa. El color azul de las colonias pone de manifiesto la expresión del gen delator lacZ de forma que la enzima expresada metaboliza el sustrato X-Gal del medio y la colonia adquiere esta coloración. (B) Ensayo de crecimiento; pone de manifiesto la expresión del gen delator LEU2, ya que las levaduras auxótrofas para leucina son capaces de crecer en un medio Leu⁻. En ambos ensayos todas las pruebas realizadas dieron un resultado de interacción positivo.

Estos ensayos permiten determinar una mayor o menor afinidad en la interacción entre las proteínas debido a un sistema de múltiples operadores LexA bajo el que están

Resultados

los genes delatores. Aunque ambos genes delatores están bajo el control de múltiples operadores LexA, es en el ensayo de la β -galactosidasa en el que se aprecia mejor la diferencia en la afinidad entre las proteínas en función de la diferente intensidad en la coloración que toman las colonias, de forma que un azul más intenso implica mayor afinidad, mientras que un azul más tenue es indicativo de interacciones débiles.

Interacciones MRE11-NBS1

Se analizaron dieciséis interacciones entre las diferentes proteínas MRE11 y NBS1, realizadas en ambas direcciones de forma que el total de ensayos realizaros fue de treinta y dos. Para cada interacción probada se analizaron nueve colonias de levaduras mediante el test de la β -galactosidasa. Se realizaron los controles de autoactivación con las nuevas construcciones empleadas en estas pruebas así como los controles de toxicidad. No se observaron casos ni de autoactivación ni de proteínas tóxicas para las células.

En cuanto a los ensayos de interacción los resultados obtenidos fueron negativos para todas las combinaciones probadas, tanto en el test de crecimiento como en el de los filtros para la β -galactosidasa. Estos resultados se muestran en la *Figura 4.38*.

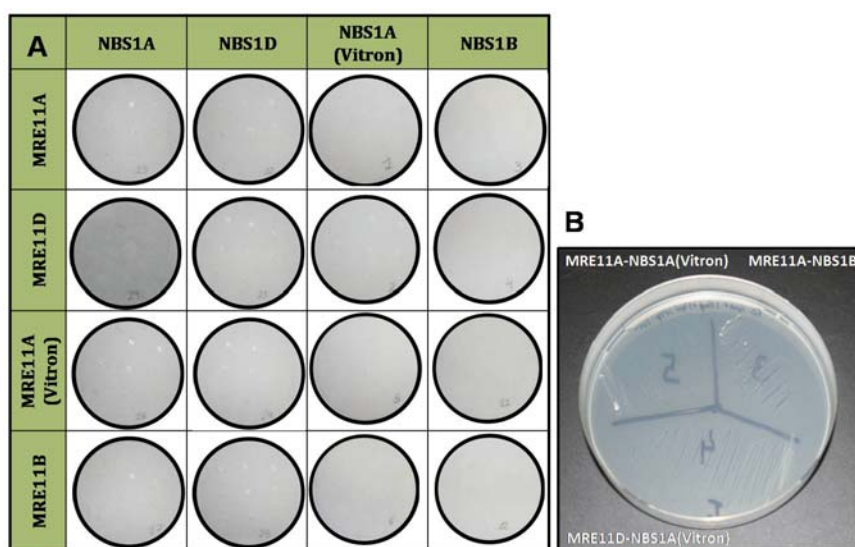


Figura 4.38 Resultados de los análisis de interacción mediante la técnica de doble híbrido entre las proteínas MRE11 y NBS1 de trigo. (A) Test en filtro de la β -galactosidasa. (B) Test de crecimiento. No se detectó interacción en ninguna de las combinaciones probadas.

Interacciones RAD50-NBS1

Las interacciones estudiadas fueron dieciséis al igual que en los casos anteriores, correspondientes a todas las combinaciones posibles de unión entre RAD50-NBS1. El número total de ensayos fue de treinta y dos ya que todas las interacciones se probaron en ambos sentidos. En este ensayo tampoco se encontraron casos de toxicidad ni de autoactivación para las proteínas híbridas que participan en este nuevo ensayo. En cuanto a la interacción entre las proteínas RAD50 y NBS1 de trigo no se pudo detectar interacción en ningún caso, obteniéndose resultados negativos en las pruebas de crecimiento y de la β -galactosidasa (*Figura 4.39*).

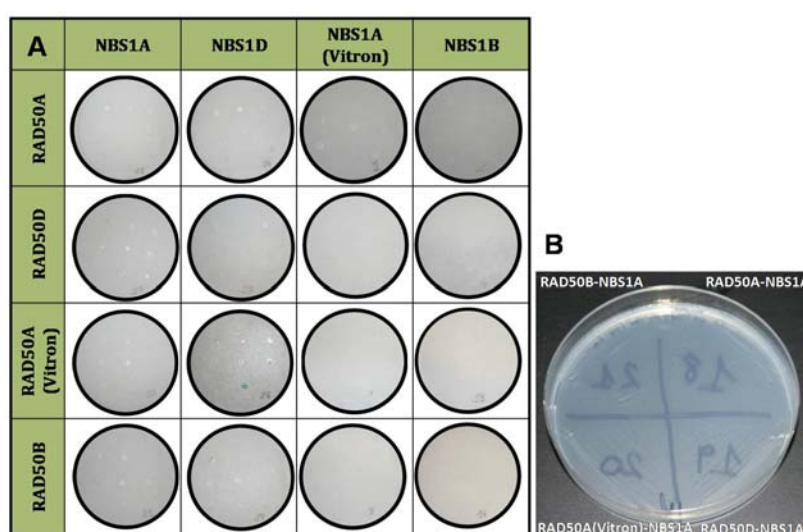


Figura 4.39 Pruebas de interacción entre las proteínas RAD50 y NBS1. (A) Test de la β -galactosidasa. (B) Test de crecimiento. En ambos casos los resultados fueron negativos.

Formación de homodímeros MRE11-MRE11, RAD50-RAD50 y NBS1-NBS1

Ya que se ha descrito que las proteínas MRE11 y RAD50 están presentes en el complejo de recombinación MRN en forma de homodímeros, se realizaron ensayos de doble híbrido para detectar estas interacciones. Además, se analizó la posible interacción entre subunidades de la proteína NBS1 para formar homodímeros, a pesar de que hasta el momento no se ha descrito ninguna situación en la que se haya detectado este tipo de interacciones. En todos los casos se analizaron las distintas combinaciones posibles de formación de homodímeros, realizando un total de veintiocho ensayos en cada caso.

Resultados

En el caso de los dímeros MRE11-MRE11 se detectó interacción en todos los ensayos, con resultados positivos tanto en el test de crecimiento como en el de la β -galactosidasa (Figura 4.40).

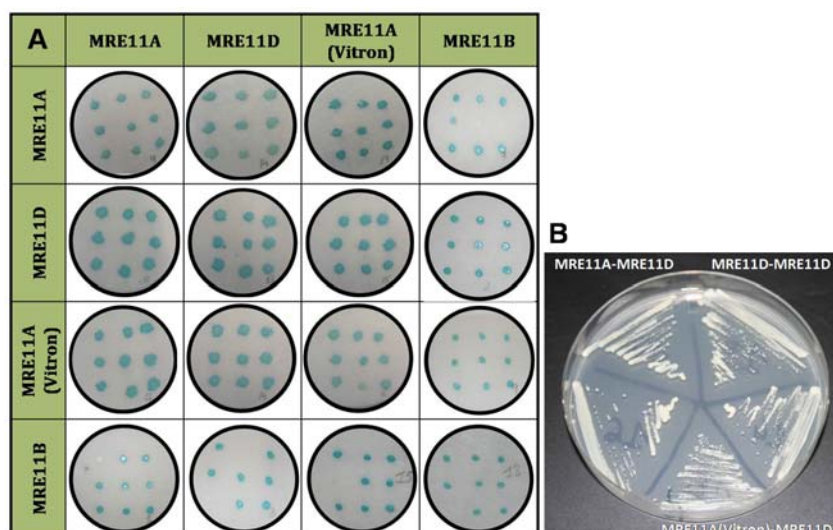


Figura 4.40 Pruebas de interacción MRE11-MRE11. (A) Test de la β -galactosidasa. (B) Test de crecimiento. En ambas pruebas los resultados fueron positivos.

Sin embargo en el caso de la formación de dímeros RAD50-RAD50 no se detectó interacción en ninguna de las interacciones probadas (Figura 4.41).

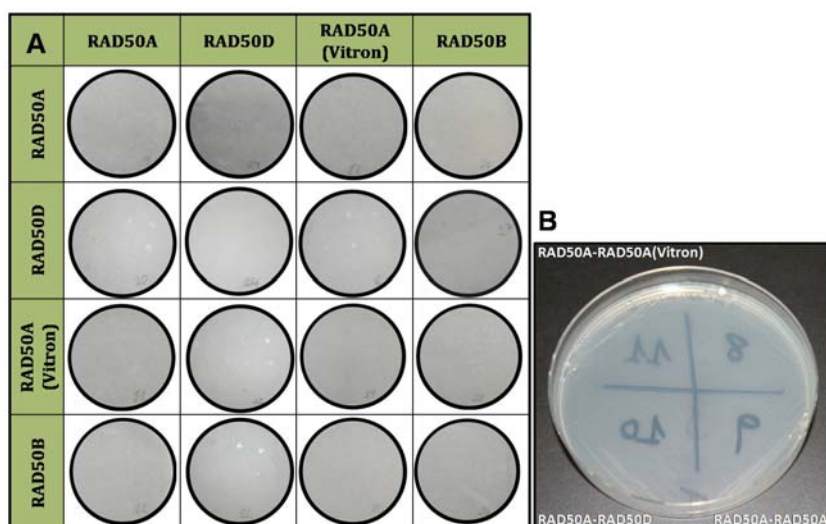


Figura 4.41 Resultados para la formación de dímeros RAD50-RAD50. (A) Test de la β -galactosidasa. (B) Test de crecimiento. En ambas pruebas los resultados fueron negativos.

Tampoco se encontró señal de interacción entre NBS1 que dieran lugar a la formación de homodímeros (Figura 4.42).

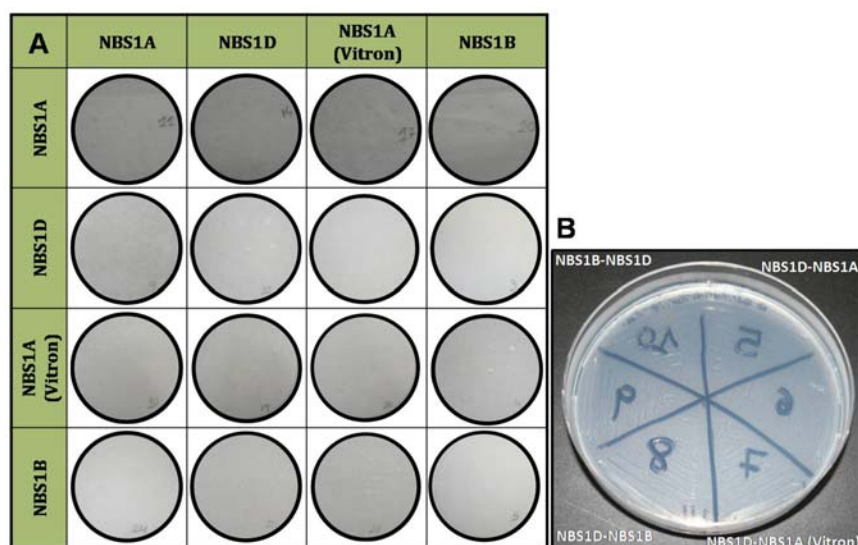


Figura 4.42 Resultados para la interacción NBS1-NBS1. (A) Test de la β -galactosidasa. (B) Test de crecimiento. En ambas pruebas los resultados fueron negativos.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El presente trabajo trata de avanzar en el conocimiento de los problemas que plantea una eficiente utilización de las técnicas de la transformación en plantas superiores. El estudio se enmarca en una línea de investigación que pretende aumentar la eficiencia de la transformación genética mediante el desarrollo de metodologías que permitan dirigir de forma controlada la introducción de los transgenes dentro del genoma de las plantas, proceso que se conoce como *gene targeting*. Uno de los objetivos es el de determinar cómo y en qué frecuencia se produce la recombinación homóloga (HR) en células somáticas de cereales, concretamente en trigo y cebada, de manera similar a los estudios que se están llevando a cabo en especies modelo de plantas como pueden ser *Arabidopsis thaliana* y tabaco. Una de las vías para alcanzar el *gene targeting* es fomentar la recombinación homóloga entre el transgén y el genoma de la planta receptora en células somáticas. En base a esta finalidad se han desarrollado dos tipos de acciones. La primera conduce a la obtención de unas formas transformadas de cereales que *a posteriori* nos permitan analizar la eficiencia de la recombinación homóloga. El segundo grupo de estudios se ha dirigido al conocimiento de uno de los sistemas genéticos implicados en la recombinación, el sistema MRN, tanto en el aspecto estructural de los tres genes implicados (*Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*) en los genomas A, B y D de trigo, y de las proteínas que codifican, como en su aspecto funcional en las especies diploides y alopoloides del trigo.

En este apartado, se revisan los principales resultados obtenidos en este trabajo a la luz de los conocimientos previos de otros autores y en diferentes especies.

5.1. ESTUDIO DEL MECANISMO DE LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

El principal modo de integración de los transgenes en plantas, al igual que en la mayoría de los eucariotas superiores, es mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ), ya que ésta es la vía principal de reparación de roturas de doble cadena en células somáticas. En algunos casos se ha visto que el transgén puede integrarse en una zona homóloga del genoma mediante HR, pero desgraciadamente la frecuencia de tal hecho es mínima (10^{-5} -

10^{-7}) si se compara con la frecuencia de NHEJ. No obstante, se pueden desarrollar estrategias que permitan aumentar la frecuencia de HR frente a la de NHEJ a la hora de integrar los transgenes. Una de estas vías consiste en producir roturas de doble cadena en una zona determinada del genoma y a la vez suministrar secuencias homólogas a estas regiones, ya que se ha visto que secuencias homólogas de regiones ectópicas o alélicas que se encuentren disponibles en la proximidad de la rotura, pueden ser empleadas como molde en la reparación (Orel y col., 2003), produciéndose un aumento de la frecuencia de este fenómeno vía HR (Puchta, 1999). Si entre las secuencias homólogas suministradas se introduce un transgén, éste puede ser integrado en la zona donde se ha inducido la rotura del ADN, es decir, se podría determinar el lugar donde se integraría el transgén alcanzándose de esta manera el *gene targeting*.

Como paso previo en este trabajo se ha tratado de obtener líneas transgénicas de trigo y cebada en las cuales se pudiese detectar la recombinación homóloga, mediante la monitorización de la restauración del gen marcador de la β -glucuronidasa (gen GUS), presente en las construcciones utilizadas en este estudio. Dichas construcciones, que fueron utilizadas previamente en trabajos de este tipo en especies modelo (Orel y col., 2003), incluyen, además del gen delator, dianas para la endonucleasa de restricción I-*SceI*. Ésta es una enzima mitocondrial de levaduras, con diana de 18 pb, lo que hace muy infrecuente la presencia de esta diana en cualquier genoma. Se emplearon tres construcciones deladoras diferentes, pDGU.US, pDU.GUS y pIU.GUS, las cuales permiten estudiar la restauración del gen GUS como consecuencia de distintos mecanismos basados en la recombinación homóloga. Así en el caso de la construcción pDGU.US se encuentra una diana para I-*SceI* localizada entre dos repeticiones directas del gen GUS con una región solapante de 557 pb a cada lado de la diana. Las construcciones pDU.GUS y pIU.GUS son similares, con el gen GUS interrumpido igualmente por una región de 34 pb que contiene la diana para I-*SceI*, que hace que el gen no sea funcional, encontrándose aguas arriba un fragmento interno de 1.087 pb del gen en orientación directa o inversa respecto al gen completo, según se trate de la construcción pDU.GUS o pIU.GUS, respectivamente.

El objetivo de esta parte del trabajo era el de determinar el mecanismo de integración de los transgenes mediante HR en cereales. Se ha visto que en regiones donde se encuentran secuencias repetidas en tándem, las roturas producidas en estas regiones pueden ser reparadas hasta en una tercera parte de los casos mediante HR por un

mecanismo conocido como SSA (Siebert y Puchta, 2002; Xiao y Peterson 2000). Este mecanismo implica el empleo de secuencias homólogas repetidas para la reparación de la rotura tomando éstas como molde, siendo no obstante un mecanismo no conservativo ya que supone la delección de la región situada entre las repeticiones. Como alternativa al mecanismo de reparación mediante SSA, estaría el modelo de SDSA que da lugar a fenómenos de conversión génica entre secuencias homólogas alélicas o ectópicas, suponiendo la transferencia de información desde estas secuencias homólogas donadoras a los sitios de rotura, sin pérdida de la secuencia en el *locus* donador (Bray y West, 2005; Puchta, 2005). Las construcciones utilizadas permiten la detección de la reparación de las roturas de tipo DSB mediante cualquiera de estas dos vías; así las construcciones pIU.GUS y pDU.GUS suponen sustratos de recombinación para la reparación según el modelo de SDSA, que implica procesos de conversión génica sin llegar a perder la secuencia donadora, que en este caso sería el fragmento de 1.087 pb del gen GUS situado aguas arriba del gen completo. Para la construcción pDGU.US actuaría la vía de reparación homóloga SSA, que se activa cuando la rotura se produce entre regiones de secuencia repetidas, dando lugar a una delección de la región incluida entre esas repeticiones.

En los trabajos originales llevados a cabo en *Arabidopsis thaliana* (Orel y col., 2003) se observó en primer lugar un incremento de la frecuencia total de la recombinación homóloga de uno o dos órdenes de magnitud con respecto a las frecuencias encontradas fuera de este sistema de inducción de roturas, pasando de frecuencias de recombinación homóloga de 10^{-4} a 10^{-5} a obtener frecuencias de 10^{-2} a 10^{-3} en este sistema. Además se ha visto que para la construcción pDGU.US las frecuencias obtenidas son cinco veces más altas que aquellas obtenidas con las otras dos construcciones, lo que indica que la recombinación asociada con delecciones explicada según el modelo de SSA es una vía más eficaz de reparación homóloga en plantas. No obstante, la conversión génica mediante la vía de SDSA parece presentar una frecuencia suficiente para jugar un papel importante en la reparación en plantas, sin llegar a influir en el proceso la orientación de la secuencia donadora. Al igual que en *Arabidopsis thaliana*, el uso de ambos tipos de construcciones daría idea de cuál es el mecanismo principal de integración mediante HR en cereales, lo cual es de gran importancia a la hora de diseñar futuras estrategias de *gene targeting* en estas especies.

5.1.1. OBTENCIÓN DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS

El punto de partida para llevar a cabo el estudio de los mecanismos de recombinación homóloga en cereales empleando el sistema antes descrito es la obtención de las plantas transgénicas portadoras de las construcciones pDGU.US, pDU.GUS y pIU.GUS, así como de una construcción que lleve el gen para la enzima de restricción I-SceI. Como construcción portadora de este enzima se empleó en un primer momento pDISceI, la cual no portaba ningún agente selector lo que dificultó enormemente el proceso de selección. Posteriormente fue sustituida por la construcción pAR-ISceI la cual, además del gen codificante de la enzima, también portaba el gen marcador *NptII* de resistencia a kanamicina.

En la transformación se emplearon las variedades de trigo ‘Bobwhite’, ‘Florida’ y ‘Chinese Spring’, y posteriormente se añadió la variedad ‘Golden Promise’ de cebada. La estrategia seguida fue la transformación de embriones inmaduros mediante infección con *Agrobacterium*. El protocolo de transformación de trigo se basó en el trabajo de Cheng y col. (1997) en el que trabajaron con la variedad ‘Bobwhite’ de *T. aestivum*, así como en el trabajo de Wu y col. (2003) en el que emplearon, entre otras, las variedades ‘Bobwhite’ y ‘Florida’. La transformación de cebada se basa en el trabajo de Tingay y col. (1997) en el que emplearon la misma variedad de cebada utilizada en este trabajo.

Aunque la transgénesis es una técnica ampliamente usada en plantas modelo como son *Arabidopsis thaliana*, tabaco y arroz, no ha sido hasta la última década cuando se han desarrollado estrategias que permiten la aplicación de estas técnicas en cultivos tradicionalmente recalcitrantes como la cebada y el trigo. Un gran problema a la hora de llevar a cabo la transformación en estos dos cereales es que este proceso es en gran parte dependiente del genotipo empleado, de modo que la obtención de plantas transgénicas adultas y fértiles está limitada a unas pocas variedades (Jones, 2005; Shrawat y Lörz, 2006), entre las cuales estarían ‘Bobwhite’ y ‘Florida’ para el trigo, y ‘Golden Promise’ para cebada, todas ellas empleadas en este trabajo. La elección de estos genotipos se debe a su facilidad de regeneración a partir de cultivo *in vitro*, y a la demostración de resultados aceptables de transformación en otros trabajos. Por otra parte, la elección del escutelo de embriones inmaduros como explante ha sido crucial en la transformación mediada por *Agrobacterium*, por presentar una buena capacidad de regeneración en

cultivo *in vitro*. A pesar de esto son muy pocos los trabajos de transformación en trigo publicados hasta la fecha, siendo muchas veces los protocolos descritos en los mismos difíciles de reproducir (Jones, 2005).

En el presente trabajo se transformaron en total 4.440 embriones de la variedad ‘Bobwhite 26’, 790 embriones de ‘Bobwhite 29’, 4.295 de ‘Florida’ y 265 de ‘Chinese Spring’. En conjunto, las plántulas regeneradas fueron 46, pero hay que tener en cuenta que aquellas procedentes de las transformaciones con la construcción pDISceI (26 plantas de las 46 totales) no fueron sometidas a ningún tipo de selección ya que el plásmido carecía de marcador seleccionable para la transformación, por lo que las 20 plántulas restantes resultaron ser escapes a la selección, y ninguna de ellas resultó ser transgénica.

En los trabajos de referencia para trigo las tasas de transformación (nº de plantas transgénicas por cada 100 explantes infectados) obtenidas se sitúan entre 1,4 y 4,3 (Cheng y col., 1997), y 0,3 y 3,3 (Wu y col., 2003). En estos trabajos utilizaron los genotipos ‘Bobwhite’ y ‘Florida’, respectivamente, utilizando como explante en ambos casos el escutelo de embriones inmaduros. El hecho de que sólo se obtuvieran 26 plántulas de los 2.615 embriones transformados con la construcción pDISceI implica una baja tasa de regeneración en principio no esperada para estas variedades de alto índice de regeneración. La explicación más probable de estas bajas tasas de regeneración y de transformación es la existencia de algún cuello de botella en el proceso de transformación durante el cultivo *in vitro*, aún cuando en todo caso se han seguido los protocolos descritos con anterioridad por otros autores. Esto redundaría en la idea generalizada de que los protocolos descritos para la transformación de trigo mediante *Agrobacterium* son bastante complejos y poco reproducibles, en el sentido de que pequeñas variaciones en la aplicación de los protocolos, en la mayor parte de los casos incontrolables, pueden producir efectos negativos en el éxito de la transformación.

Dado el bajo rendimiento de la transformación de trigo, se decidió llevar a cabo también la transformación de cebada mediada por *Agrobacterium*, con las mismas construcciones, empleando para ello la variedad ‘Golden Promise’, ampliamente usada en este tipo de experimentos debido a su alta tasa de regeneración en cultivo *in vitro*. En este caso se siguió un protocolo de transformación basado en el descrito por Tingay y col. (1997), transformando un total de 5.466 embriones, de los cuales 762 fueron transformados con la construcción pDISceI que carece de marcador seleccionable. De

estos 762 embriones, tras el paso de inducción de callos y regeneración, se obtuvieron más de 2.000 plántulas, lo que demuestra la enorme tasa de regeneración de esta variedad si la comparamos con el caso anterior en trigo, donde para la misma construcción regeneraron un número mucho menor de plántulas. Debido al alto número de plántulas regeneradas, el análisis de las mismas para la búsqueda de plantas transgénicas fue de gran dificultad. Sólo se pudieron analizar 720 de estas plantas, encontrándose una sola planta positiva por PCR, que posteriormente fue confirmada mediante Southern Blot, aunque esta planta no llegó a dar semillas. Del resto de embriones, 1.570 fueron transformados con una u otra de las construcciones pDU.GUS o pIU.GUS, 773 con la construcción pDGU.US, y 2.361 con pAR-ISceI.

En el proceso de transformación hay varios factores clave a la hora de asegurar el éxito en el proceso (Jones y col., 2005; Tingay y col., 1997); entre ellos cabe destacar el material de partida empleado como explante, así como la cepa de *Agrobacterium* usada en la infección y el plásmido que porta. En el presente trabajo se obtuvo una eficiencia de transformación de cebada entre 0,3 y 2,5% (Tabla 5.1), obteniéndose resultados similares en todos los casos, excepto para las transformaciones con la construcción pDGU.US, en que la eficiencia se ve incrementada hasta alcanzar un 2,5%. La tasa de transformación obtenida es similar a la publicada en otros trabajos, como por ejemplo en el de Travella y col., (2005) con una tasa de 2%, o el trabajo original con una tasa algo superior, de 4,2% (Tingay y col., 1997).

Construcción	Resistencia	Embriones transform.	Plántulas regenerad.	Plantas transgén.	Escapes selecc.	Tasa de transform.
pIU.GUS pDU.GUS	Higromicina	1.570	15	5	66%	0,3%
pDGU.US	PPT	773	36	19	47%	2,5%
pCISceI	-	762	>2.000	1	-	≈ 0,1%
pAR-ISceI	Kanamicina	2.361	123	14	89%	0,6%

Tabla 5.1 Resumen de datos acerca de la eficiencia de transformación de cebada, así como el porcentaje de plantas regeneradas que resultaron ser escapes al sistema de selección.

Ya que en todos los casos se trabajó con la misma variedad de cebada, y los embriones fueron recogidos de igual forma realizando transformaciones simultáneas con cada una de las construcciones, el único factor que parece marcar la diferencia es la construcción empleada en la transformación. Este hecho por un lado afecta claramente al

número de escapes a la selección encontrados en cada caso, de forma que el sistema de selección más efectivo ha sido el realizado mediante fosfinotricina (PPT) ya que algo menos de la mitad de las plántulas regeneradas resultaron ser escapes. En el caso de la selección con higromicina hasta un 66% de las plántulas regeneradas no contenían el transgén, y en el caso de la selección con kanamicina, ésta resultó ser la menos efectiva ya que hasta un 89% de las plántulas obtenidas tras la selección eran escapes. En cuanto a las diferencias en la tasa de transformación, en principio parece existir una relación con el tipo de agente selector empleado, habiéndose observado mejores resultados en el caso en que se emplea el herbicida, frente al uso de antibióticos. No obstante, en la bibliografía no se han encontrado referencias a este dato, trabajando los distintos grupos con resistencias a antibióticos o herbicidas indistintamente. Es más, en el trabajo desarrollado por Matthews y col., (2001) consiguieron aumentar la tasa de transformación en cebada hasta un 12% empleando higromicina en sustitución del herbicida bialaphos. Estas observaciones dispares reflejarían de nuevo la gran variación de resultados de transformación entre distintos laboratorios aplicando el mismo método, lo que indica la complejidad del proceso de transformación en las especies aquí utilizadas.

En el momento actual se tienen semillas portadoras de las construcciones pIU.GUS y pDGU.US. Las plantas de cebada transgénicas para pAR-ISceI están creciendo a la espera de poder recoger las semillas. En el caso de la construcción pDU.GUS no se obtuvo ninguna planta portadora de esta construcción, aunque debido a la semejanza de ésta con la construcción pIU.GUS se puede continuar el estudio de la recombinación homóloga con las plantas portadoras de esta construcción. El siguiente paso consistirá en la realización de los cruzamientos entre las plantas homocigotas para las construcciones deladoras y las plantas homocigotas para la construcción pAR-ISceI, determinando de esta manera la frecuencia y el mecanismo de HR en cereales a semejanza de los trabajos ya realizados en *Arabidopsis* por el grupo del Dr. Puchta (Orel y col., 2003).

5.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN Y DE INTERACCIÓN DE LOS GENES *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*

5.2.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

El complejo MRN tiene un importante papel como sensor específico de lesiones de tipo DSB en el ADN, participando por un lado en el procesamiento de estas roturas tanto a nivel bioquímico como estructural, y por otro en el ensamblaje de complejos macromoleculares implicados en la respuesta celular a roturas de tipo DSB. De los tres componentes del complejo MRN, *Mre11* y *Rad50* se encuentran tanto en procariotas como eucariotas, y están muy conservados, lo que sugiere que son precursores ancestrales en la detección y reparación de DSB, y que probablemente co-evolucionaron con los procesos de recombinación. La tercera subunidad del complejo MRN es *Nbs1* (*Xrs2* es su homólogo en *Saccharomyces cerevisiae*), está mucho menos conservado y sólo se encuentran homólogos en eucariotas; *Nbs1* probablemente se unió a *Mre11* y *Rad50* en eucariotas con la evolución de los puntos de control del ciclo celular, y la adopción de nuevos papeles del complejo MRN en el mantenimiento de la integridad del genoma (Assenmacher y Hopfner, 2004).

En este trabajo se ha realizado una caracterización molecular de los tres sistemas genéticos (*Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*), mediante el aislamiento de las secuencias genómicas de los genes homeólogos y de los mensajeros productos de su expresión, pertenecientes a cada uno de los tres genomas (A, B y D) del trigo hexaploide *T. aestivum*. Dado el elevado grado de conservación de estos genes en las distintas especies, principalmente *Mre11* y *Rad50*, para su aislamiento se empleó una estrategia basada en la información proporcionada por las secuencias ya obtenidas en otros organismos, trasladando esta información al material objeto de nuestro estudio, y consiguiendo su amplificación y caracterización en varias especies de trigo. Este tipo de estrategia basada en la genómica comparada es habitualmente utilizada en aquellos casos en que se trabaja con organismos de los que no se dispone de información sobre la secuencia de su genoma, y ha sido aplicada anteriormente para aislar nuevos genes en trigo (De Bustos y col., 2000, 2001; De Bustos y Jouve 2003, 2006). Para su aplicación en este trabajo, se han empleado las

secuencias genómicas y de ADN copia procedentes de especies relacionadas como arroz, *Arabidopsis thaliana* y en algunos casos maíz, y varias secuencias de *ESTs* de cebada, centeno y trigo.

A continuación se discuten algunos aspectos de los resultados de la caracterización molecular de las secuencias génicas y de su grado de conservación, para tratar después los resultados de las propiedades estructurales y funcionales de las proteínas codificadas por los mismos.

El trabajo comenzó con la caracterización del gen *Mre11*, y en un primer momento se tomó como material de partida el ADN genómico de la variedad ‘Chinese Spring’ de *T. aestivum* (AABBDD). Se hicieron varios ensayos empleándose distintas parejas de cebadores para la amplificación del gen. En todos los casos la amplificación se resolvía en una única banda de ADN, lo que no permitía la diferenciación de los genes homeólogos *Mre11* al tener éstos el mismo tamaño. Además, el hecho de tener que realizar la amplificación de los genes en varios fragmentos debido a su gran tamaño, dificultaba la asignación de los distintos clones obtenidos a un genoma concreto. Por todo ello, se eligió la alternativa de trabajar con especies diploides y tetraploides, portadoras de los genomas del trigo común, lo que facilita el hecho de encontrar una correspondencia entre secuencias obtenidas y genomas. Así se eligió la especie diploide *T. monococcum* (AA) como representante del genoma A, a pesar de que el donador de dicho genoma es *T. urartu* (Dvorak y col., 1993), ya que ambas son especies muy próximas, con un alto grado de homología entre sus genomas. Como representante del genoma D se escogió a *Aegilops tauschii* Coss. (DD), que se supone donadora del genoma D del trigo común (Zohary y Feldman, 1962). En el caso del genoma B, se ha propuesto a la especie *Aegilops speltoides* ($2n=2x=14$, SS) como donadora más próxima de este genoma (De Huang y col., 2002; Bustos y Jouve, 2003; Petersen y col. 2006), aunque no se reconoce ninguna especie diploide actual portadora de un genoma B idéntico al de las especies poliploides actuales. Para resolver la caracterización de los genes del genoma B se trabajó con el trigo tetraploide *T. turgidum* cv. ‘Vitron’ (AABB). De este modo, se trataba de diferenciar las dos hipotéticas secuencias de los genes homeólogos, procedentes una de cada genoma. La comparación de los dos tipos de secuencias obtenidas a partir de este trigo con las obtenidas a partir de *T. monococcum* permitiría identificar aquellas correspondientes al genoma A, siendo atribuible la segunda al genoma B. Estas mismas

especies han sido utilizadas por otros autores para relacionar genes homeólogos con los distintos genomas del trigo (Johnson y Bhave, 2004).

Siguiendo para los tres genes esta misma estrategia de amplificación, se obtuvieron las secuencias genómicas y de ADN copia de cada uno de los tres genes estudiados, *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*, para los genomas A, B y D de trigo. Estos genes han quedado caracterizados por primera vez en trigo, y su conocimiento se une al de sus ortólogos de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y en algún caso también *Zea mays*.

En los casos de las especies diploides *T. monococcum* y *Ae. tauschii*, no se encontraron variantes para ninguno de estos tres genes, salvo en un caso que se describe más adelante, de forma que todos los clones presentaban la misma secuencia. Por otra parte, la coincidencia entre ADN genómico y ADN copia era prácticamente total, encontrándose del orden de 1 diferencia por cada 2.000 pb. Las escasas diferencias se pueden atribuir a errores puntuales del proceso de aislamiento, como lo confirma el hecho de que a pesar de haber empleado polimerasas de alta fidelidad de copia (con tasa de error en torno a 10^{-7}), la tasa de error de la enzima transcriptasa reversa, empleada en la obtención del ADN copia, es de entre 10^{-3} a 10^{-5} .

De igual forma, en el caso de las secuencias obtenidas para *T. turgidum*, éstas se agrupaban en dos clases distintas que se asignaron posteriormente a los genomas A y B, encontrándose una correspondencia perfecta entre ADN genómico y ADN copia en los tres genes. La comparación de estas secuencias con las obtenidas a partir de *T. monococcum*, permitió asignar las secuencias de *T. turgidum* a los genomas A y B, ya que el grado de conservación entre los genes procedentes del genoma A es muy alto. Para realizar esta asignación de las secuencias de *T. turgidum* al genoma A, se emplearon principalmente las regiones de los intrones, ya que al ser todos ellos genes muy conservados y por tanto muy similares, es únicamente en estas regiones donde se encuentran unas mínimas diferencias suficientes para poder diferenciar entre genomas.

Al analizar las secuencias de ARNm en muestras humanas se han encontrado diferentes isoformas tanto para el caso de *Mre11* (Petrini y col., 1995), como para los casos de *Rad50* (Dolganov y col., 1996) y *Nbs1* (Saar y col., 1997), presentando todos ellos dos isoformas de la proteína. En el caso del trigo, la mayor parte de los clones secuenciados no han presentado variaciones, y sólo en algunos pocos se han detectado

algunas modificaciones que, en todo caso, darían lugar a proteínas truncadas que en principio no serían funcionales. Un ejemplo de esto ocurre en el caso de *Mre11*, de forma que en la especie *Ae. tauschii* se secuenció un clon de ADN copia en el que se estaba expresando el intrón 5 del gen, resultando en un cambio del marco de lectura que tras la traducción daría lugar a una proteína truncada de 210 aminoácidos, que contendría los tres primeros dominios fosfoesterasa de la proteína. Este transcrito sería minoritario ya que se encontró un único clon de ADN copia con esta secuencia entre todos los clones secuenciados, y en cualquier caso daría lugar a una proteína no funcional al carecer de cualquier dominio activo completo, pudiendo tratarse incluso de un error transcripcional puntual. El resto de los clones secuenciados de ADN copia corresponden a transcritos perfectamente normales que tras la traducción darían lugar a proteínas funcionales, sin haberse detectado formas alternativas de ARNm como ocurre en humanos.

Los ensayos de Southern Blot han demostrado la existencia de una sola copia de cada uno de los tres genes, *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*, por genoma en el trigo. Sin embargo, en el hombre se han encontrado pseudogenes de *Mre11* en los cromosomas 3 y 7 (Petrini y col., 1995), y en el caso de maíz se han aislado dos genes parálogos *Mre11A* y *Mre11B*, aunque uno de ellos daría lugar a una proteína truncada que no sería funcional (Waterworth y col., 2007). Aunque en trigo no se ha detectado la existencia de pseudogenes ni parálogos para *Mre11*, sí se encontró un ARN mensajero distinto que codificaría para una proteína no funcional, como se ha descrito anteriormente. Estos resultados junto con la obtención en todos los casos de las moléculas de ADN copia procedentes de la expresión de estos genes homeólogos, permite conocer que estos genes duplicados se han mantenido en las especies poliploides y además se expresan todos ellos dando lugar en principio a proteínas funcionales.

Una vez conocidas las secuencias de ADN copia de los tres sistemas de genes del complejo MRN se procedió a obtener las secuencias de proteínas deducidas a partir de las mismas. Con estas secuencias se realizaron alineamientos en los que también se incluyeron proteínas ortólogas de otros organismos. De este modo se pudo comprobar el alto grado de conservación de los sistemas génicos homeólogos del trigo, en torno al 98%, tanto si se comparan las secuencias genómicas y de ADN copia, como si la comparación se lleva a cabo en las secuencias de aminoácidos deducidas de las proteínas. Este resultado indica la importancia de estos genes, que ejercen funciones vitales para las

células y por tanto tienden a variar poco y son mantenidos evolutivamente sin apenas cambios entre ellos (Ciaffi et al. 2006). El elevado grado de conservación de los genes del sistema MRN, contrasta con el grado de homología que presentan otros genes homeólogos, de función diferente y menor importancia para la supervivencia, como son los genes que codifican para las gluteninas de alto peso molecular (Gs-HMW) presentes en el endospermo de la semilla (De Bustos y col., 2000, 2001; De Bustos y Jouve, 2003, 2006). En el caso de las proteínas MRE11 y RAD50 se encontró una elevada homología con las proteínas maíz y arroz, superior al 80%, descendiendo hasta un 64% al compararlas con las proteínas de *Arabidopsis thaliana*. Se puede comprobar que en el caso de NBS1 esta conservación es mucho menor, siendo la homología tan sólo del 34% al comparar las proteínas de trigo y *Arabidopsis thaliana*. Estos datos concuerdan con lo descrito en otras especies, donde ya se había visto que el grado de conservación de *Nbs1* es mucho menor que el de *Mre11* y *Rad50*, limitándose a dominios muy concretos (Assenmacher y Hopfner, 2004). Estos resultados apoyarían la idea anteriormente mencionada de la existencia de genes *Mre11* y *Rad50* ancestrales que participarían en los primeros sistemas de reparación de roturas del ADN, a partir de los cuales se originaron los diferentes genes ortólogos presentes en la actualidad.

De acuerdo con Assenmacher y Hopfner (2004) el gen *Nbs1* pudo entrar a formar parte del complejo MRN con posterioridad a los genes *Mre11* y *Rad50*, al tiempo que los sistemas de reparación evolucionaban hacia una mayor complejidad. A pesar de todo, dada la baja homología existente entre los distintos genes caracterizados en eucariotas, no parece clara la existencia de un gen ancestral común para todos ellos. Una de las posibles explicaciones es que el origen del gen *Nbs1* sea distinto, es decir, a partir de otro gen no relacionado que evolutivamente alcanzaría funciones similares. Alternativamente, otra explicación al origen de *Nbs1* es que a partir de un gen ancestral se originaron evolutivamente los genes de los distintos organismos, genes que fueron paulatinamente soportando grandes variaciones en la mayor parte de su secuencia, a excepción de la mayor parte de los dominios característicos donde la variación fue menor. Esta explicación supondría una mayor tasa de variación en este gen respecto de *Mre11* y *Rad50*, algo en principio no esperado, tratándose todos ellos de genes cuyas funciones son vitales para la integridad celular.

Una vez caracterizadas las secuencias de los genes y deducidas las de las proteínas se han podido identificar los distintos dominios estructurales y funcionales de cada una de ellas, de acuerdo a la caracterización de estas mismas proteínas en otros organismos. En el caso de la proteína MRE11 de trigo, para los tres genomas, se identificaron los cuatro dominios fosfoesterasa que definen la actividad nucleasa de la proteína, localizados en la mitad N-terminal. En el alineamiento llevado a cabo, se puede ver que estos dominios presentan una gran homología entre todas las especies analizadas, incluso tratándose de especies tan alejadas evolutivamente del trigo como la levadura o el hombre. También se ha encontrado un dominio de unión a ADN en la región central de la proteína, donde el grado de homología entre los ortólogos disminuye ligeramente, sobre todo con la humana y la de levadura. A la vista de estos alineamientos se observa que las pocas diferencias encontradas entre las proteínas de trigo normalmente se localizan fuera de los dominios conservados. En cuanto a los dominios de unión a NBS1 y RAD50, se localizarían en las regiones N-terminal y C-terminal, respectivamente, aunque no se han definido exactamente las regiones correspondientes a los mismos, al igual que para un segundo dominio de unión a ADN en C-terminal. La existencia de estos dominios en las secuencias caracterizadas se pone de manifiesto por la gran homología que presentan respecto de otras proteínas previamente caracterizadas y por el hecho de que se han detectado uniones entre ellas, al menos con RAD50, mediante los ensayos de doble híbrido.

En el caso de RAD50 se han definido los dominios ATPasa de tipo ABC (*ATP Binding Cassette*) en N-terminal y en C-terminal (Hopfner y col., 2000, 2001, 2002; Wiltzius y col., 2005); estas regiones a su vez contienen dominios menores como son Walker A y Walker B, así como los dominios *P-loop*, *Q-loop*, *D-loop* y *H-loop*. También se encuentra el dominio *hook* con la secuencia conservada CXXC implicada en la coordinación de iones de zinc para la interacción entre dos complejos, de forma que al comparar este dominio en las proteínas de trigo con las otras proteínas de plantas conocidas se ha visto que la secuencia consenso CXXC para este dominio en plantas sería CPCC. A ambos lados de este dominio se encuentran las regiones de la cola, que se plegarán de forma antiparalela para dar lugar a la estructura característica de estas proteínas. En este caso las regiones más conservadas se corresponden con los dominios ATPasa, encontrándose gran homología entre todas las proteínas estudiadas, y observándose que las diferencias encontradas entre las proteínas RAD50 de trigo se

encuentran fuera de estos dominios mencionados, y especialmente fuera de los dominios ATPasa conservados.

En cuanto a NBS1, las proteínas expresadas a partir de los distintos genomas de trigo presentan una alta homología, similar a los casos anteriores; sin embargo, cuando son comparadas con las procedentes de otras especies esta homología es mucho menor, quedando reducida en el caso de humanos y levaduras a pequeñas regiones de unos pocos aminoácidos en los dominios FHA y de unión a MRE11. En trigo se han localizado los dominios FHA y BRCT, ya descritos en otras proteínas como es el caso de la proteína NBS1 humana, aunque el dominio BRCT está ausente en la proteína XRS2 de levaduras (Kobayashi y col., 2004). Al igual que en el resto de genes caracterizados (Desai-Mehta y col., 2001; Paull y Gellert, 1999; Tauchi y col., 2001) hay dos puntos de posible fosforilación por parte de kinasas como pueda ser ATM, motivos SQ en la región central de la proteína, y los dominios de unión a las proteínas MRE11 y ATM en C-terminal. Son estos últimos dominios los que aparecen especialmente conservados, junto con el dominio FHA cuando se comparan con otras proteínas ortólogas, y de hecho el dominio de unión a MRE11 fue empleado por el grupo de Akutsu y col. (2007) para hacer una búsqueda en las bases de datos, a partir del dominio de la proteína de pollo, encontrándose así las primeras proteínas NBS1 en plantas, concretamente en arroz y *Arabidopsis thaliana*.

Un aspecto añadido a la caracterización molecular de los genes del sistema MRN es el de su localización cromosómica. En principio es importante señalar que la localización de secuencias de ADN de copia única en plantas es un objetivo complicado, entre otras razones por la presencia de la pared celular que dificulta la obtención de preparaciones cromosómicas de buena calidad, siendo frecuente la presencia de citoplasma en las mismas, lo que aumenta el ruido de fondo de señales inespecíficas (Khrustaleva y Kik, 2001). Además el alto grado de compactación del ADN en los cromosomas metafásicos de las especies vegetales, así como el gran tamaño del genoma y el alto contenido en secuencias repetidas en el caso concreto del trigo, dificultan aún más este objetivo (Wang y col., 2006). Por ello hasta la fecha, la gran mayoría de trabajos de *FISH* realizados en cereales se han limitado a la localización de secuencias de ADN repetidas (Cuadrado y col., 2000; Cuadrado y Jouve, 2007a, 2007b; Cuadrado y Schwarzacher, 1998; Heslop-Harrison y col., 1991). No obstante, dada la longitud del gen *Rad50*, próximo a las 17 kb y la capacidad de distinguir los 42 cromosomas del trigo con

diversas sondas de ADN repetitivo mediante FISH (Cuadrado y col., 2000), se optó por intentar la localización de este gen.

Para eludir estas limitaciones se planteó el uso de técnicas de amplificación de la señal empleándose al efecto el sistema conocido como *Tyr-FISH*, que se aplicó para la localización de los genes *Rad50*. Las preparaciones fueron re-hibridadas con sondas de las secuencias repetitivas del ADN ribosomal 5S (sonda pTa794), y de este modo se logró localizar el gen e identificar el cromosoma portador. El locus fue localizado en el brazo corto de los cromosomas del grupo de homología 5 de trigo, quedando la señal de hibridación en posición subproximal respecto al *locus* para ADN ribosomal 5S, detectado con la sonda pTa794 (Gerlach y Dyer, 1980). En el hombre el gen *Rad50* se ha localizado en el cromosoma 5 (Dolganov y col., 1996), mientras que en *Arabidopsis thaliana* y en arroz se localiza en ambos casos en el cromosoma 2. Tras el estudio de los mapas de sintenia contruidos para arroz y trigo, no se ha visto relación en este aspecto en cuanto a la localización del gen *Rad50*, y aunque principalmente se ha encontrado una correspondencia del cromosoma 2 de arroz con los cromosomas del grupo de homología 6 de trigo, hay múltiples marcadores localizados en el cromosoma 2 de arroz que a su vez han sido localizados de forma dispersa en el genoma de trigo.

Hasta la fecha, son muy pocos los trabajos que hacen referencia a la localización de secuencias de ADN de copia única en plantas, limitándose muchos de ellos a la localización de estas secuencias en preparaciones de cromosomas en la fase de paquitena (De Jong y col., 1999; Peterson y col., 1999; Wang y col., 2006) donde el grado de compactación de la cromatina es menor, aumentado así el límite de detección de la técnica. Este tipo de análisis no es válido para el trigo ya que no es posible la identificación de los distintos cromosomas en dicha fase de meiosis. Además, gran parte de los trabajos realizados en este aspecto, parten del conocimiento previo de la localización aproximada de la secuencia diana, lo que permite descartar gran parte de las señales inespecíficas de *background* en las preparaciones, y centrarse en aquellas señales que aparecen en las localizaciones esperadas (Sadder y col., 2000; Khrustaleva y Kik, 2001; Koumbaris y Bass, 2003).

El único trabajo encontrado en la literatura que localiza genes mediante FISH en cereales es el llevado a cabo por Cabrera y col., (2002) en el que se localizan los *loci Glu-1* de las gluteninas de alto peso molecular (HMW) en el trigo hexaploide *T. aestivum*. En

su trabajo los citados autores utilizaron sondas de un tamaño de 14,6 kb, que engloban tanto la secuencia del gen *Glu-D1-1d* que codifica para la glutenina HMW 1Dx5, como las regiones flanqueantes, aunque es posible que la secuencia diana en el cromosoma sea algo mayor, ya que en los loci *Glu-1* se encuentran dos genes estrechamente ligados y de alto grado de homología que codifican para los tipos “x” e “y” de la gluteninas HMW. A diferencia del caso de los genes *Rad50*, se partía del conocimiento de la localización cromosómica de los genes *Glu-1* fruto de otros análisis, antes de que se procediera a su visualización mediante FISH.

En el caso de los genes *Mre11* y *Nbs1*, actualmente se está intentando llevar a cabo su localización aplicando la misma técnica que con *Rad50*, con la limitación de que las sondas disponibles para tal fin abarcarían regiones mucho menores, de 5.000 pb y 3.700 pb, respectivamente, correspondiendo con el tamaño de los genes, y encontrándose éste último en el límite de detección planteado para dicha técnica (Wang y col., 2006).

Los datos de localización cromosómica del gen *Rad50* en trigo fueron confirmados mediante el análisis por PCR de dos líneas nulitetrasómicas para los cromosomas del grupo de homología 5, N5DT5A y N5AT5B. Mediante el análisis de este tipo de líneas se puede asignar un fragmento de ADN de copia única a un cromosoma determinado, quedando para las técnicas de FISH la localización física más exacta dentro del cromosoma. Las series aneuploides ofrecen la localización cromosómica, o a lo sumo de brazo si se emplean formas ditelocéntricas, pero no siempre es posible contar con las series completas y por otro lado existen problemas de estabilidad de estas líneas. No obstante, debido a la dificultad ya mencionada para la detección de genes de copia única en cereales mediante hibridación *in situ*, el empleo de estas líneas nulitetrasómicas son una buena alternativa para poder llevar a cabo la asignación de genes a cromosomas, al menos mientras se ajustan las condiciones de hibridación y detección de la señal para mejorar el rendimiento en la localización de secuencias de copia única de menor tamaño mediante FISH.

5.2.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*

En las especies aloploiploides confluyen los genomas y los genes de especies filogenéticamente relacionadas, por lo que se suman los genomas y los genes homeólogos de las especies diploides, tras un período de diversificación evolutiva, equivalente al tiempo transcurrido desde su separación a partir de un ancestro común. Es por tanto interesante el análisis de la expresión comparada de los genes homeólogos, no sólo con relación a las especies diploides sino en los aloploiploides en que puedan sumar o variar su actividad debido a la duplicación de sus funciones. De hecho en algunos casos se han observado cambios considerables en la expresión de los genes duplicados, atribuidos normalmente a los procesos de remodelación de su actividad tras la hibridación inter-específica que originaron estas nuevas especies (Adams, 2007). El trigo común *T. aestivum* constituye un sistema ideal para el estudio de estos procesos ya que es una especie aloploiploide relativamente joven (con unos 8.500 años, Chantret y col., 2005), del que se conocen la mayoría de los donantes genómicos. Además, se pueden obtener los poliploides sintéticos, por hibridación inter-específica y duplicación cromosómica, lo que permitiría llevar a cabo análisis de expresión de los genes homeólogos duplicados.

Los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*, caracterizados en este trabajo en las formas diploides y poliploides del trigo, ofrecen un marco adecuado para el análisis de su expresión en los genomas individuales y en los sistemas genómicos integrados de las formas aloploides.

El análisis de expresión de estos genes se ha llevado a cabo empleando dos técnicas diferentes que permiten conocer distintos aspectos de su expresión en los materiales de estudio. En primer lugar se han realizado ensayos de PCR cuantitativa, para conocer los niveles globales de expresión para cada uno de los tres genes en las distintas especies de trigo. En segundo lugar, se ha empleado la técnica de SSCP con detección por fluorescencia, que permite analizar la expresión relativa de cada uno de los genes homeólogos en las especies poliploides.

5.2.2.1. Análisis de expresión mediante PCR cuantitativa

Los ensayos se realizaron por un lado a partir de un *pool* de ARN obtenido de varias espigas en meiosis recogidas de diferentes plantas a fin de minimizar las posibles alteraciones en la expresión debidas a estadios distintos en el desarrollo de la espiga. Además se recogieron de forma independiente espigas de individuos para estudiar las posibles variaciones intra-específicas en los niveles de expresión. Estos ensayos fueron planteados con el fin de establecer una relación de los niveles de expresión de cada uno de los genes, entre las distintas especies estudiadas, teniendo en cuenta que éstas presentan distinto nivel de ploidía.

El estudio de la expresión del gen *Mre11* demuestra que los menores niveles de expresión corresponden a la especie *Ae. tauschii*, tanto al analizar la muestra del *pool* de ARN, como para las muestras de los individuos, encontrándose en este último caso ligeras variaciones para los distintos individuos analizados. Las especies *T. monococcum* y *T. turgidum*, diploide y tetraploide respectivamente, presentan niveles similares de expresión, que a su vez casi duplica la encontrada en *Ae. tauschii*, siendo algo menores en la especie tetraploide *T. turgidum*, con poca variación intra-específica al analizar los individuos. *T. monococcum* presentó una mayor variación intra-específica. La especie hexaploide *T. aestivum* mostró los mayores niveles de expresión, presentando también variaciones entre los tres individuos analizados. Los resultados obtenidos para *Rad50* son muy similares y los niveles de expresión son semejantes entre las especies diploides y la especie tetraploide, al menos en el caso de las muestras del *pool* de ARN. Los menores niveles de expresión los presentó *T. monococcum*, siendo un poco superiores en *Ae. tauschii* y *T. turgidum*, sin llegar a duplicar en ningún caso la expresión encontrada en el calibrador. Al igual que en *Mre11*, la mayor expresión se detectó en *T. aestivum* que mostraba también grandes variaciones intra-específicas. En el caso de la expresión de *Nbs1*, los resultados son igualmente semejantes a los encontrados para *Mre11*, con la diferencia de que es en este gen donde se encontraron las mayores variaciones a nivel intra-específico.

Estos resultados no muestran una clara correlación entre los niveles de expresión de los genes y los niveles de ploidía de las especies analizadas, aunque sí parecen demostrar una tendencia a una mayor expresión en *T. aestivum* en todos los casos

analizados, con unos niveles de expresión próximos entre sí en las otras tres especies. Llama la atención el hecho de que *T. turgidum*, a pesar de ser una especie tetraploide, no muestre una expresión mayor a la encontrada en las especies diploides, contrariamente a lo que en principio cabría esperar. Éste y otros aspectos relacionados con las especies poliploides han sido aclarados gracias a la utilización de poliploides sintéticos en otros trabajos.

La obtención de líneas hexaploides sintéticas fue realizada por primera vez por McFadden y Sears (1944), y desde ese momento se ha convertido en una práctica rutinaria para la obtención de líneas estables y muy similares morfológicamente al trigo común. Se han publicado numerosos trabajos en los que se utilizan poliploides sintéticos como el realizado por He y col., (2003) en el que se obtuvieron trigos hexaploides a partir de las líneas parentales *Ae. tauschii* y *T. turgidum*. Mediante los estudios realizados con estas líneas se ha podido observar que la mayoría de las alteraciones en los patrones de expresión y casos de silenciamiento se producen de forma casi inmediata al proceso de hibridación (Adams, 2007), y aunque no se conocen los mecanismos responsables de estos fenómenos, se ha asociado frecuentemente con la metilación de citosinas, y en algunos casos también con la modificación de histonas (Adams, 2007).

El hecho de que en la especie tetraploide *T. turgidum* no se observe un nivel aumentado de la expresión de estos genes, encontrándose niveles cercanos o incluso menores a aquellos hallados en las especies diploides, podría ser atribuido a un fenómeno de compensación de dosis génica tras el proceso de hibridación que dio lugar al origen de esta especie (Wendel, 2000). Por otra parte, los niveles de expresión para cualquiera de los tres genes en *T. aestivum* es muy superior a los encontrados en el resto de especies, hecho que también implica cambios en la regulación de la expresión de estos genes, aunque en este caso lo que se estaría produciendo es una sobreexpresión de los mismos con respecto a las especies progenitoras.

El trigo hexaploide *T. aestivum* apareció por un fenómeno de hibridación entre *T. turgidum* y *Ae. tauschii*, tras un período de 0,5 millones de años desde la aparición del tetraploide *T. turgidum* (Chantret y col., 2005). No obstante, aunque la modificación de la expresión de estos genes en *T. turgidum* se produjera tras el fenómeno de la hibridación que dio lugar a esta especie, puede que tras el nuevo proceso de hibridación que originó a *T. aestivum* esta expresión volviera a modificarse, ya que es un proceso controlado por

mecanismos epigenéticos y por lo tanto reversible (Adams, 2007). Una posible explicación para el nivel aumentado de transcritos de los genes investigados en *T. aestivum* podría ser la necesidad de una mayor precisión en los sistemas de reparación de roturas de tipo DSBs en el ADN, y una mayor disponibilidad de los componentes implicados en este proceso, debido a la mayor carga genética. Se puede suponer que la presencia de tres juegos de cromosomas homeólogos en las formas hexaploides haya exigido una adaptación de las regiones implicadas en los procesos de recombinación homóloga en meiosis, eludiendo el reconocimiento de las homeólogas. Esta hipotética remodelación de las regiones de apareamiento podría haber producido efectos secundarios sobre los mecanismos de expresión de los genes. En cualquier caso, el importante papel funcional de estos genes, puesto de manifiesto por el elevado grado de conservación que presentan, induce a suponer que cualquier remodelación de los mismos es crítica para la supervivencia de la especie.

Por otro lado, la gran variación encontrada a la hora de analizar las muestras obtenidas entre individuos de la misma especie se puede atribuir a distintas etapas del desarrollo del material recogido, en este caso a partir de las células madre de polen. A diferencia del caso anterior en el que se recogió un *pool* de espigas de distintas plantas, en el caso del análisis individual, se utilizaron una o dos espigas por individuo. Ya que la expresión de estos genes da lugar a proteínas implicadas en procesos celulares muy precisos y circunscritos en tiempo a las primeras etapas de la meiosis, es muy posible que la activación de la transcripción de estos genes exija un ajuste fino de su regulación, de manera que se produzca en una etapa muy concreta del desarrollo de las células madre de polen. Así pequeñas variaciones en cuanto al estado de desarrollo de las células madre de los gametofitos pueden suponer grandes cambios en los niveles de expresión de los genes.

Dado que estos tres genes han de ser expresados de forma coordinada y simultánea, para poder realizar su función celular, se puede realizar un estudio relacionando la expresión de cada uno de los tres genes entre sí, para cada especie. Para ello se tiene en cuenta únicamente el valor medio de ΔC_t obtenido para los tres genes en cada una de las especies analizadas, tomando como calibrador aquel gen que ha presentado el menor nivel de expresión (Tabla 5.2). A excepción de *T. aestivum* en la que se utilizó el valor de *Mre11* como calibrador, en el resto de las especies se utilizó *Rad50*.

		Avg $\Delta Ct \pm Sd$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
<i>T. monococcum</i> (AA)	<i>Mre11</i>	15,60 \pm 0,27	-1,81	3,5
	<i>Rad50</i>	17,41 \pm 0,26	0	1
	<i>Nbs1</i>	10,42 \pm 0,61	-6,99	127,1
<i>Ae. tauschii</i> (DD)	<i>Mre11</i>	16,66 \pm 0,25	-0,27	1,2
	<i>Rad50</i>	16,93 \pm 0,08	0	1
	<i>Nbs1</i>	11,48 \pm 0,59	-5,45	43,7
<i>T. turgidum</i> (AABB)	<i>Mre11</i>	15,92 \pm 0,27	-0,71	1,63
	<i>Rad50</i>	16,63 \pm 0,04	0	1
	<i>Nbs1</i>	10,12 \pm 0,34	-6,51	91,1
<i>T. aestivum</i> (AABBDD)	<i>Mre11</i>	13,88 \pm 0,16	0	1
	<i>Rad50</i>	13,66 \pm 0,38	-0,22	1,2
	<i>Nbs1</i>	8,38 \pm 0,38	-5,5	45,2

Tabla 5.2. Valores de $\Delta\Delta Ct$ y $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculados para los tres genes de forma independiente para cada especie estudiada.

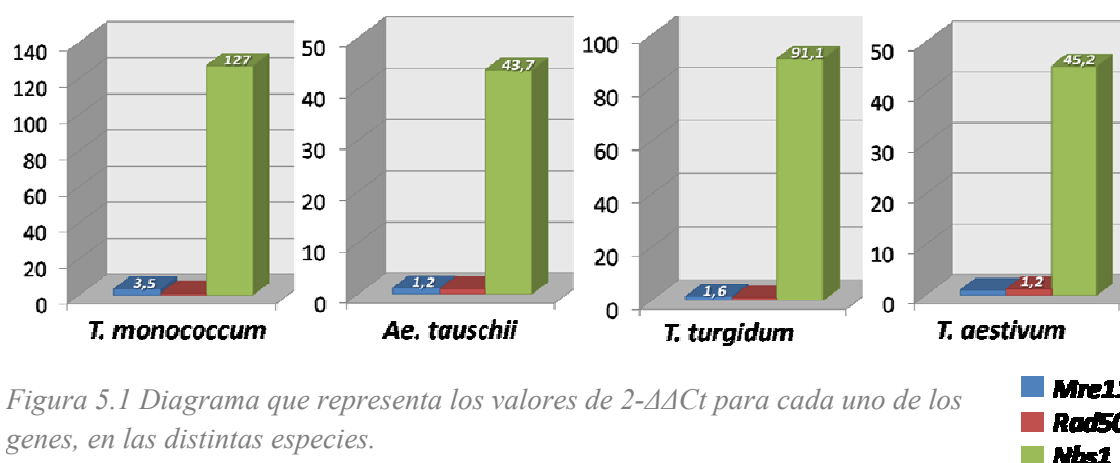


Figura 5.1 Diagrama que representa los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada uno de los genes, en las distintas especies.

Los resultados obtenidos al realizar este análisis fueron sorprendentes (Figura 5.1), destacando los altos niveles de expresión del gen *Nbs1*, mientras que *Mre11* y *Rad50* presentan unos niveles de expresión bajos, y muy similares entre ellos. El papel de *Nbs1* en meiosis no está muy claro, habiéndose obtenido diferentes resultados según los organismos en que se ha estudiado su actividad. Así en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, está muy estudiada la función del complejo MRX en meiosis, donde se ha visto que *Xrs2* (equivalente a *Nbs1*) tiene un papel fundamental siendo responsable de la localización de *Mre11* en el núcleo. La presencia de este gen es imprescindible además para la formación de las roturas DSB en meiosis por parte de SPO11 (Borde, 2007). Hasta el momento sólo se conocen dos casos, en *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans*, en que la presencia previa del complejo MRN sea necesaria para la formación de

las roturas meióticas catalizadas por SPO11. Por el contrario, en mamíferos y plantas donde se han estudiado estos procesos (Borde, 2007; Puizina y col., 2004; Wiltzius y col., 2005) se ha visto que el complejo MRN actúa tras la formación de las roturas por SPO11, participando en la retirada de esta proteína de los extremos generados, y en el procesamiento de estos extremos para formar colas de cadena sencilla 3' que servirán como sustrato para RAD51, otra proteína que actúa en este proceso, de forma que en ausencia del complejo sí se formarían las roturas meióticas, pero no serían procesadas. En este caso NBS1 también sería responsable de la localización del complejo en los puntos de rotura, y aunque la formación de las roturas no sea dependiente de MRN, parece que el complejo se localiza ya en estos puntos, previo a la actuación de SPO11.

En el trabajo de Waterworth y col. (2007) se describe el papel de la proteína NBS1 en la recombinación meiótica en *Arabidopsis thaliana*. La utilización de mutantes del gen *Nbs1* demuestra el papel crucial de esta proteína en células somáticas y se desvelan varios aspectos sobre su papel en la meiosis de esta especie. La proteína NBS1 parece ser necesaria para la localización del complejo MRN en las zonas de rotura, tanto del tipo DSB en células somáticas como las que preceden al mecanismo de sobrecruzamiento en la meiosis. En mamíferos se ha visto que NBS1 participa en la vía de señalización de ATM del daño en el ADN, donde NBS1 dirige a ATM al lugar de la rotura con la consecuente activación de ATM y la fosforilación de una serie de proteínas diana. En *Arabidopsis thaliana* el papel de NBS1 en la ruta de señalización es similar, aunque en ausencia de NBS1 también se produce activación de ATM con lo que es posible que el papel de ATM en meiosis no sea dependiente de NBS1, o tenga vías alternativas de reparación (Borde, 2007).

En cuanto al papel en meiosis de los otros dos componentes del complejo, MRE11 y RAD50, participarían en el procesamiento de los extremos generados tras las roturas producidas por SPO11. En primer lugar se produce la retirada de esta proteína que queda unida covalentemente a los extremos 5' de las roturas, para lo cual actuaría la función endonucleasa de MRE11, y posteriormente se generarían largas colas de cadena simplexa 3', sobre las que actuaría a continuación RAD51. RAD50 podría tener únicamente un papel estructural manteniendo unidas las cromátidas hermanas del cromosoma, de forma que éste mantenga una arquitectura apropiada, formado un complejo pre-DSB meiótico (Borde, 2007).

A la vista de estos posibles modos de acción de las proteínas del complejo MRN es complicado explicar los altos niveles de expresión de *Nbs1* encontrados en las especies de trigo analizadas, ya que las tres proteínas son necesarias durante la meiosis, con papeles importantes y críticos cada una de ellas. Se puede concluir por tanto que existe aún bastante desconocimiento sobre el funcionamiento del complejo, lo que ha producido diferentes hipótesis y resultados contradictorios en la bibliografía. Un dato a tener en cuenta es que mientras que MRE11 y RAD50 actuarían siempre juntos formando el heterotetrámero M_2R_2 , o el complejo MRN, NBS1 tiene una mayor independencia con respecto a estas proteínas. En este caso, NBS1 podría encontrarse o bien asociada a este heterotetrámero participando en el complejo MRN, o actuando por sí sola en los procesos de localización de la rotura para el posterior reclutamiento de MRE11 y RAD50, junto con otros componentes participantes del proceso. Además NBS1 está implicada en la ruta de señalización mediada por la kinasa ATM, actuando aguas arriba de la misma para reclutar a la propia ATM, para después actuar como sustrato de esta kinasa. Se inicia así una compleja cascada de señalización y fosforilación de una serie de sustratos, de forma que la fosforilación de NBS1 parece que tendría una función de amplificación favoreciendo el reclutamiento y fosforilación de otros componentes de la ruta (Akutsu y col., 2007; Kobayashi y col., 2002, 2004; Lavin, 2007; Olson y col., 2007; Tauchi y col., 2001; Uziel y col., 2003; Waterworth y col., 2007; Williams y col., 2007). De acuerdo con esto, es posible que los requerimientos de NBS1 sean superiores a los de MRE11 y RAD50. En primer lugar para canalizar la localización del resto de los componentes de forma inmediata hacia los lugares de rotura, y en segundo lugar por su participación en una ruta de señalización fundamental para el mantenimiento de la integridad del genoma. Los mayores niveles de expresión de *Nbs1* observados en este trabajo corroboran esta hipótesis.

Los genes *Mre11* y *Rad50* presentan en todos los casos niveles similares de expresión, lo que tiene sentido ya que no se ha descrito ninguna situación en que actúen por separado, de manera que para llevar a cabo sus funciones biológicas se encuentran en las células formando heterotetrámeros M_2R_2 o formando el complejo MRN, de manera que los requerimientos de estas proteínas serían similares. En el trabajo de Johzuka y Ogawa (1995) se analiza la expresión para ambos genes, y se observa que tanto en situaciones de inducción de roturas de tipo DSB en el ADN como en meiosis, los niveles de expresión de estos genes aumentan de igual forma, con similares cinéticas de

transcripción, lo que induce a suponer que debe existir un mecanismo de regulación coordinado de estos dos genes. El tipo de ensayo realizado en este trabajo no permite abordar el análisis de la hipotética relación existente entre la expresión encontrada en este material en meiosis, con aquella encontrada en células en las que su expresión no esté activada. Un punto interesante por el que continuar con este estudio sería el de analizar la expresión de estos genes en otras situaciones, tanto en estados de normalidad celular en células somáticas, como en situaciones de estrés causado por la inducción de roturas de ADN de tipo DSB. Así se podría conocer el incremento real en los niveles de expresión de estos genes, y determinar si este desequilibrio hacia la expresión de *Nbs1* que se observa en células meióticas se está produciendo de igual forma en células somáticas, o si por el contrario los altos niveles de expresión de *Nbs1* son específicos de la entrada de las células en meiosis.

5.2.2.2. Análisis de expresión mediante SSCP

El estudio de las posibles diferencias en los niveles de expresión de genes duplicados es de gran interés en las especies de plantas superiores. Tras la duplicación génica en formas diploides o autoploides, o tras la confluencia de genes ortólogos en un genoma común en las alopoloides, se pueden producir diferentes fenómenos relacionados con la modificación de los niveles de expresión, que pueden suponer el silenciamiento de alguna de las copias (Wendel, 2000), o incluso la adquisición de funciones diferentes para cada uno de los genes duplicados. Este fenómeno ha sido denominado “neofuncionalización”, y se puede deber a la alteración o subfuncionalización de alguno de los genes duplicados (“modelo de subfuncionalización” de Hughes, 1994).

Aunque se conocen muchos casos de genes duplicados en especies diploides (Simillion y col., 2002; Blanc y col., 2003; Bowers y col., 2003; Paterson y col., 2004) la duplicación de genes es más evidente en especies poliploides, donde todos los genes presentan un número de copias equivalente al grado de poliploidía. Por ello, tras aislar y caracterizar los genes homeólogos que forman el complejo MRN en este trabajo, en las especies alopoloides de trigo, parecía conveniente el estudio de los niveles relativos de expresión. Esto permitiría avanzar en el conocimiento de la evolución de los mecanismos

de expresión de este tipo de genes que poseen una función crítica para el funcionamiento celular, como consecuencia de lo cual están muy conservados.

Para poder abordar este tipo de análisis es necesario aplicar una técnica que permita discernir los productos de expresión simultánea de los genes homeólogos presentes en las mismas plantas. En el caso del sistema MRN los genes homeólogos se diferencian muy poco y dan lugar a transcritos muy similares, que varían tan sólo en un reducido número de nucleótidos. Además poseen una región codificante (exones) de idéntico tamaño. Para este análisis se eligió la técnica conocida como SSCP (Cronn y Adams, 2003), a la que se aplicaron una serie de modificaciones con el fin de hacerla más simple, eliminar los aspectos negativos asociados a la misma como es el empleo de productos radiactivos, y objetivar al máximo sus resultados.

El uso de un marcaje mediante fluorescencia en sustitución de la radiactividad, y de un analizador genético en lugar de los geles de acrilamida, hace de ésta una técnica más “limpia”, siendo además un proceso más rápido, y de lectura automática. El tiempo de la resolución de los fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR se acorta hasta menos de una hora, que es lo necesario para el análisis de las muestras por el analizador genético. También cabe destacar la máxima precisión que supone el hecho de poder cuantificar los fragmentos en función de las áreas de los picos que son resueltos por el analizador genético, en lugar de tener que referir estos datos a medidas de intensidad de las bandas obtenidas en geles de acrilamida, generalmente de forma visual.

La técnica de SSCP por fluorescencia puesta a punto en este trabajo demostró una alta precisión y repetitividad, como fue puesto de manifiesto en los análisis que se realizaron partiendo de muestras con mezcla de ADN copia procedentes de la expresión de genes homeólogos en concentraciones conocidas, de forma similar a los análisis realizados en la técnica original (Cronn y Adams, 2003). Así se establecieron unos límites resolutivos para esta técnica estando siempre los valores obtenidos dentro de los intervalos de confianza establecidos en cada caso. En los casos en que la concentración de uno de los fragmentos llega a ser tan baja como de 100 veces inferior a la del fragmento mayoritario, se han encontrado desviaciones para los valores obtenidos que casi igualan al valor de concentración de estos fragmentos. En cualquier caso, en los análisis realizados en este trabajo nunca se han encontrado valores de expresión tan dispares, de forma que las diferencias en los niveles de los transcritos estudiados nunca han sido superiores a tres

veces. En estos análisis de puesta a punto de la técnica, el valor de 1:7 queda ligeramente fuera del intervalo de confianza establecido. En la técnica original descrita por Cronn y Adams (2003) el número de valores que se sitúan fuera de los intervalos es mayor, quedando 5 de las 11 muestras analizadas fuera de dichos intervalos, correspondiendo 4 de ellas a los valores de concentración más equilibrados, que son 1:7, 1:3, 1:1 y 3:1.

En primer lugar se procedió a la asignación de los picos obtenidos en los que se resuelven los productos de PCR con los productos de expresión de los genes de los genomas A, B y D. Este análisis inicial se realizó a partir de las especies diploides *T. monococcum* y *Ae. tauschii*, que permiten la asignación directa de los picos correspondientes a los genomas A y D, respectivamente. Este estudio fue paralelo al análisis de los clones obtenidos en la etapa de caracterización molecular de estos genes, confirmando así la asignación realizada anteriormente entre clones y genomas.

Una de las pruebas que determinan la fiabilidad de la técnica consiste en la amplificación de muestras de ADN genómico procedente de las especies poliploides, en las cuales se deben obtener valores similares para cada uno de los genes homeólogos (Cronn y Adams, 2003). Así en el caso de la especie *T. turgidum* se deben detectar dos picos con áreas relativas del 50% cada uno, correspondientes a la amplificación a partir de los genomas A y B, mientras que en *T. aestivum* se deben observar tres picos, con áreas en torno al 33%. Estos fueron los resultados obtenidos cuando se realizó el análisis de SSCP del gen *Mre11*. En el caso de *Nbs1*, se ha encontrado que la pareja de cebadores empleados (SSCP Nbs-L3/SSCP Nbs-R3) presenta una buena eficiencia de amplificación para *T. turgidum*, pero no para *T. aestivum*, donde la amplificación procedente del genoma A es menor que la esperada, mientras que la amplificación a partir del gen *Nbs1D* es mayor. Por ello no se han podido llevar a cabo en este caso los análisis de expresión relativa para la especie hexaploide, siendo para ello necesario un nuevo diseño experimental.

Los resultados obtenidos al analizar la expresión del gen *Mre11* muestran una menor expresión del gen homeólogo *Mre11B* que del gen *Mre11A* en *T. turgidum*. Del mismo modo *Mre11B* muestra menor expresión que *Mre11A* y *Mre11D*, que presentan niveles muy semejantes, en *T. aestivum*. En el tetraploide *T. turgidum* se encontró una proporción en los niveles de transcritos de *Mre11A:Mre11B* de aproximadamente 2:1, mientras que en *T. aestivum* la proporción *Mre11A:Mre11B:Mre11D* se ha estimado en

2:1:2. Al igual que en los ensayos de PCR cuantitativa, se trabajó también con muestras de ARN extraído a partir de individuos independientes, encontrando resultados similares, y siempre menores niveles de expresión de *Mre11B*. En el caso de los individuos de *T. turgidum* analizados las diferencias de expresión entre ambos genes no eran tan acusadas.

En el estudio de expresión de los genes *Rad50*, no se encontraron grandes diferencias entre los homeólogos, obteniendo valores de expresión relativa muy similares entre *Rad50A* y *Rad50B* en *T. turgidum*, así como entre *Rad50A*, *Rad50B* y *Rad50D* en *T. aestivum*. En este último caso se detecta una expresión algo superior en el caso de *Rad50A*, sin que esta diferencia llegue a ser significativa. Los estudios de expresión de *Nbs1* en la especie *T. turgidum* evidenciaron unos resultados similares a los obtenidos para *Mre11*, encontrándose una expresión reducida en el caso del homeólogo *Nbs1B*, siendo ésta tres veces menor que para *Nbs1A*.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en los fenómenos de hibridación que dan lugar a especies aloploidoides se han observado cambios en la expresión de genes comparados con la encontrada en los progenitores, además de que cada copia puede presentar distintos niveles de expresión. La utilización de “neopoliploides” o poliploides sintéticos parece demostrar que las modificaciones en la expresión pueden ser inmediatas, como consecuencia del proceso de poliploidización, afectando a muchos de los genes. Esto se ha observado tanto en los “neopoliploides” como en aloploidoides naturales en *Arabidopsis thaliana* (Wang y col., 2004), algodón (Adams y col., 2003), y trigo (He y col., 2003) lo que sugiere un proceso controlado y dirigido a la alteración de la expresión de los genes en que se han llevado a cabo estos estudios.

La existencia de una menor expresión del gen perteneciente al genoma B en el caso del gen *Mre11* en ambas especies poliploides sugiere que probablemente la alteración en la expresión se inició tras el primer suceso de hibridación, para dar lugar a la especie tetraploide *T. turgidum*, y que esta alteración permaneció cuando se produjo el siguiente paso de hibridación que originó la especie hexaploide. De esta forma, se habría producido probablemente una reducción en la expresión del gen *Mre11B* a la mitad, por lo que la expresión relativa de este gen con respecto al total sería aproximadamente 1/3. En consecuencia, la concentración de los transcritos procedentes de la expresión del gen *Mre11A* debe ser el doble que la de *Mre11B*. Curiosamente, si se compara la expresión relativa de los genes *Mre11A* y *Mre11B* en la especie hexaploide *T. aestivum*, la

expresión de *Mre11B* también es aproximadamente la mitad de la detectada para *Mre11A*, mientras que la expresión de *Mre11D* es similar a la de *Mre11A*. Este último aspecto junto con el hecho de que la especie tetraploide no ha presentado unos valores elevados de expresión respecto a las especies diploides apunta a que lo que se ha producido es una disminución en la expresión del gen *Mre11B* y no un aumento similar en la expresión de los genes *Mre11A* y *Mre11D*.

En el caso del gen *Rad50*, no se han detectado diferencias de expresión entre los genes homeólogos, de forma que los dos genes en el caso de *T. turgidum*, y los tres en *T. aestivum*, contribuirían aproximadamente de igual forma a la expresión global de *Rad50*. Independientemente de los resultados presentados en este trabajo, se ha supuesto que tras un proceso de duplicación lo normal es que no se produzca alteración en los patrones de expresión, habiéndose estimado que los genes que son silenciados que son del orden de un 6-7% en el trigo hexaploide (He y col., 2003).

Han resultado infructuosos los ensayos de expresión relativa del gen *Nbs1* en el trigo hexaploide. La dificultad radica en que los cebadores empleados hasta la fecha no han mostrado una eficiencia de amplificación similar para los distintos genes homeólogos *Nbs1* en la especie hexaploide. Este análisis se ha podido llevar a efecto en el trigo tetraploide *T. turgidum*, en donde se han encontrado una marcada diferencia en la expresión de ambos genes homeólogos, más acentuada que la hallada en *Mre11*, de manera que la expresión de *Nbs1A* es tres veces superior a la de *Nbs1B*. Se puede dar una explicación en los mismos términos que la sugerida para el caso de la expresión de los genes homeólogos *Mre11A* y *Mre11B*.

Aunque no habría ninguna razón para que los genes homeólogos del genoma B se estén expresando en menor medida de forma generalizada que los de los genomas A y D, se han descrito resultados similares en la expresión de genes de gliadinas (Kawaura y col., 2005). No obstante, no se debe olvidar que el genoma B es el que mayor diversidad presenta en trigo (Wendel, 2000), siendo además el primero en divergir a partir del ancestro común que originó los tres genomas A, B y D.

5.2.3. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE DOBLE HÍBRIDO

Por último, con el fin de estudiar las interacciones producidas entre las distintas proteínas componentes del complejo MRN, se han llevado a cabo ensayos de doble híbrido en levaduras, un método que utiliza la naturaleza modular de los activadores transcripcionales para identificar interacciones proteína-proteína.

De acuerdo con la naturaleza aloploide del trigo común y dada la presencia de proteínas homeólogas procedentes de hasta tres genomas, A, B y D, se planteó realizar estudios de interacción proteína-proteína para comprobar si existe una especificidad de genoma en la formación de los agregados, o si por el contrario se puede producir una interacción cruzada entre proteínas codificadas por los genes homeólogos de distintos genomas. Este tipo de análisis permitiría añadir alguna información al modo en que interaccionan los distintos componentes proteicos para formar los multiagregados del complejo MRN que como se ha visto en el apartado anterior, siguen planteando diversas alternativas.

Para realizar estos ensayos se trabajó con los clones de ADN copia obtenidos para cada uno de los tres genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1*, de cada uno de los genomas A, B y D. En el caso del genoma A, se trabajó con los clones obtenidos tanto de *T. monococcum* como de *T. turgidum*, probándose todas las combinaciones posibles de interacción que se podrían dar en el trigo hexaploide, para la interacción de subunidades tanto del mismo gen como de diferentes genes, realizándose todos los ensayos en las dos direcciones posibles, según estén clonados los genes en los vectores pGilda o pB42AD del sistema de levaduras.

En el presente trabajo se pudo detectar la interacción entre las proteínas codificadas por los genes *Mre11* y *Rad50* mediante los ensayos de doble híbrido en levaduras, de forma que la proteína MRE11 interacciona con cualquiera RAD50 independientemente del gen que las codifique y con igual afinidad en todos los casos. La no existencia de una especificidad de genoma en las interacciones entre las proteínas codificadas por hasta tres genes homeólogos puede explicarse en base al elevado grado de conservación de los mismos, que se traduce en alto grado de similitud que presentan las subunidades de las proteínas que codifican, especialmente en las zonas donde se localizan

los dominio de interacción entre las mismas. De hecho las pocas diferencias en la secuencia de aminoácidos entre las proteínas codificadas por los genes homeólogos se sitúan fuera de los dominios conservados.

Por otra parte, la interacción entre MRE11 y RAD50 había sido descrita en trabajos previos, habiéndose detallado la posición de los dominios de unión de MRE11 a RAD50, que estarían localizados en la región C-terminal de la proteína (Assenmacher y Hopfner, 2004; Usui y col., 1998), así como el dominio de unión de RAD50 a MRE11 que se situarían en posiciones adyacentes a los dominios Walker A y Walker B (Hopfner y col., 2000; Wiltzius y col., 2005; Williams y col., 2007), si bien parece que por parte de MRE11 no habría una sola región implicada en esta interacción sino que ésta se produciría a través de múltiples contactos (Desai-Mehta y col., 2001). Las interacciones entre MRE11 y RAD50 se han estudiado mediante microscopía de fuerza atómica, llegándose a observar los complejos heterotetraméricos M_2R_2 resultantes (de Jager y col., 2001; Hopfner y col., 2001, 2002; Moreno-Herrero y col., 2005; Williams y Tainer, 2005; Wiltzius y col., 2005). De acuerdo con lo indicado, RAD50 se une a MRE11 a través de la región globular de la cabeza, donde se localiza la función ATPasa, quedando unidas las actividades nucleasa de MRE11, la ATPasa de RAD50 y los dominios de unión a ADN (Hopfner y col., 2001). Por otra parte, mediante ensayos de doble híbrido se ha precisado la posición de los puntos de interacción utilizando proteínas truncadas en otros organismos (Desai-Mehta y col., 2001; Johzuka y Ogawa, 1995; Symington, 2002), lo que ha sido también confirmado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Paull y Gellert, 1998; Symington, 2002).

La formación de homodímeros tanto de tipo MRE11-MRE11 como RAD50-RAD50 había sido ya descrita en otros trabajos con otros organismos (de Jager y col., 2001; Hopfner y col., 2001,2002; Moreno-Herrero y col., 2005). RAD50 se encontraría formando dímeros a través de las regiones globulares de la cabeza que aparecen tras el plegamiento anti-paralelo de las regiones de la cola. Aunque se ha descrito que el dominio *hook*, que queda en el ápice de la proteína al plegarse la cola, es un dominio de interacción entre moléculas de RAD50, esta unión se produciría con posterioridad a la formación de los tetrámeros M_2R_2 , de manera que las moléculas de RAD50 en estos heterotetrámeros estarían siempre unidas a través de la región de la cabeza, y en algunos casos se podría estar produciendo también la interacción entre los dominios *hook*, bien entre las moléculas de RAD50 del mismo tetrámero, como entre distintos complejos

(Wiltzius y col., 2005). La interacción entre dos subunidades RAD50 a través de la región *hook* está condicionada por la conformación del complejo y la unión del mismo a ADN, de manera que cuando el complejo se encuentra unido a ADN se favorece la unión entre moléculas de RAD50 presentes en distintos complejos (de Jager y col., 2001; Moreno-Herrero y col., 2005).

No se ha encontrado ningún trabajo hasta la fecha que demuestre la existencia de interacciones de RAD50 para formar homodímeros mediante ensayos de doble híbrido, habiéndose observado estas conformaciones mediante microscopia de fuerza atómica (de Jager y col., 2001; Moreno-Herrero y col., 2005). La formación de dímeros MRE11-MRE11 está mejor documentada, habiéndose demostrado tanto mediante la técnica de doble híbrido (Desai-Mehta y col., 2001; Johzuka y Ogawa, 1995; Symington, 2002) como por experimentos de co-inmunoprecipitación (Paull y Gellert, 1998), aunque no se han definido exactamente los dominios implicados en estos contactos. Cabe destacar el trabajo de Anderson y col. (2001) en el que mediante la técnica de doble híbrido se demuestra la interacción de dos subunidades MRE11 para formar homodímeros. Sin embargo han observado que cuando MRE11 no está unida a RAD50, permanece predominantemente en forma de monómeros, lo que parece indicar que la dimerización de MRE11 *in vivo* es dependiente de la formación del complejo MRE11-RAD50. No obstante, no se ha encontrado en la bibliografía ninguna otra referencia a este dato.

En el presente trabajo se realizaron ensayos de doble híbrido para estudiar la formación de homodímeros MRE11-MRE11 y RAD50-RAD50. En cuanto a los primeros, se detectó interacción en todos los casos, aunque la afinidad era algo menor a la hallada en la formación de dímeros MRE11-RAD50, como revela la diferente intensidad en la coloración que adquieren las colonias de levaduras al realizar los ensayos en filtro de la β -galactosidasa. Interesa también destacar que tanto en la interacción MRE11-RAD50 como en las interacciones MRE11-MRE11 no se detectó especificidad de genoma a la hora de producirse las interacciones entre las subunidades codificadas por genes homeólogos.

Por el contrario, no se detectó interacción para la formación de homodímeros RAD50-RAD50, descartándose mediante los ensayos de toxicidad que esto pudiera deberse a un efecto tóxico de estas proteínas en las células de levadura. Como ya se ha mencionado, esta interacción está documentada mediante técnicas de microscopía, pero

no se ha encontrado ningún trabajo de doble híbrido para estudiar esta interacción. La estructura que ha de adquirir la proteína RAD50 para llevar a cabo su función es algo compleja, ya que tiene que producirse un plegamiento anti-paralelo de las regiones de la cola para dar lugar a la conformación nativa de la proteína. El método de doble híbrido podría no resultar idóneo para detectar la formación de los homodímeros por problemas de conformación de estas subunidades. Estas proteínas híbridas incorporan bien un dominio de unión a ADN o un dominio de activación de la transcripción, situado en N-terminal. La región de interacción de RAD50 para formar homodímeros se localiza en el dominio globular de la cabeza que se forma por las regiones ATPasa de ambos extremos de la proteína, tras el plegamiento de la cola. De este modo, la región ATPasa situada en el extremo N-terminal llevaría unido este dominio de unión a ADN o de activación transcripcional, lo que podría estar interfiriendo en la estructura global del dominio ATPasa y por tanto en la interacción entre dos de estos dominios para formar el dímero. Por otra parte, se ha demostrado que la dimerización de RAD50 a través de su dominio globular es dependiente de ATP (Borde, 2007), lo cual podría suponer un obstáculo para la interacción en los ensayos de doble híbrido, aunque en principio la concentración de ATP en las células de levadura debería ser suficiente para poder llevar a cabo la unión.

Finalmente, también interesa conocer la interacción de NBS1 con los otros componentes del complejo MRN. Con anterioridad a este estudio se sabía que la proteína codificada por el gen *Nbs1* interacciona con los tetrámeros M_2R_2 a través de su región C-terminal donde presenta un dominio de unión a MRE11 (Akutsu y col., 2007; Kobayashi y col., 2004; Waterworth y col., 2007). De esta forma NBS1 interaccionaría con el heterotetrámero M_2R_2 a través de su unión a MRE11 para formar el complejo MRN. Con el fin de precisar el tipo de interacción entre MRE11 y NBS1 se han realizado múltiples ensayos mediante doble híbrido (Akutsu y col., 2007; Desai-Mehta y col., 2001; Kobayashi y col., 2004; Komatsu y col., 2007; Semighini y col., 2003; You y col., 2005). De este modo se ha determinado la existencia de una región mínima en la proteína NBS1 humana necesaria para la interacción con MRE11, que coincide con los últimos 101 aminoácidos del extremo C-terminal (Desai-Mehta y col., 2001). Además, en todos los casos se ha encontrado un dominio imprescindible en este extremo de NBS1 para la interacción con MRE11, que contiene la secuencia consenso $FK_R^KF_R^KK$, conservada en todas las proteínas ortólogas NBS1 identificadas hasta la fecha en eucariotas (Akutsu y col., 2007; Waterworth y col., 2007).

En el presente estudio no se ha detectado la formación de agregados MRE11-NBS1 mediante doble híbrido en ningún caso, a pesar de que la secuencia de aminoácidos de las proteínas deducidas a partir de las secuencias de los genes NBS1 caracterizados, presentan el dominio de interacción con MRE11. De hecho, y para descartar la posibilidad de errores en el desarrollo de la técnica, se llevaron a cabo las comprobaciones más básicas del proceso, como son la correcta clonación de los ADN copia en los distintos vectores de levaduras, lo que implica la conservación del marco de lectura adecuado, así como la ausencia de errores en la secuencia que pudieran afectar a los dominios implicados en la unión. El hecho de que estos aspectos no sean los responsables de la falta de interacción detectada implicaría la existencia de otras causas más complejas, como podrían ser la no expresión del gen o la no formación de la proteína, aspectos aún por determinar.

Por otra parte, en los ensayos realizados en este trabajo tampoco se detectó interacción entre NBS1 y RAD50. Con anterioridad se habían llevado a cabo ensayos de doble híbrido para detectar esta unión (Desai-Mehta y col., 2001), que sólo se encontró mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en los que se estudian las tres proteínas en conjunto (Symington, 2002). En estos trabajos se ha visto que la interacción con NBS1 se produce únicamente a través de MRE11, lo cual explicaría perfectamente los resultados negativos obtenidos para esta interacción en este trabajo.

Finalmente, la interacción para formar dímeros NBS1 no ha sido detectada en este trabajo, no existiendo tampoco referencias en la bibliografía que indiquen la existencia de este tipo de homodímeros. Resultados similares fueron obtenidos por Desai-Mehta y col. (2001) con las proteínas humanas, en los que tampoco detectaron interacciones mediante ensayos de doble híbrido.

En resumen, los ensayos de doble híbrido entre las diferentes proteínas componentes del complejo MRN parecen indicar que no es necesaria la interacción entre componentes procedentes de genes del mismo genoma para formar los complejos. Revelan también la complejidad de la formación de los multiagregados, que dependen no sólo de la presencia de las proteínas ensayadas, enfrentadas de dos en dos, sino de otros factores no aportados por los ensayos de doble híbrido. De este modo, no se han detectado interacciones del tipo RAD50-RAD50, MRE11-NBS1, RAD50-NBS1 ni

Discusión

NBS1-NBS1, quedando demostrada la interacción entre las proteínas en las interacciones MRE11-RAD50, MRE11-MRE11.

Nota: parte de los resultados descritos en el presente trabajo han sido publicados en el número 114 de la revista Theoretical and Applied Genetics, concretamente los datos referentes a la caracterización molecular del gen Mre11, junto con los correspondientes estudios de expresión mediante PCR cuantitativa y SSCP por fluorescencia. Esta publicación se adjunta en el Anexo IV.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio de los procesos de recombinación homóloga en dos cereales de elevado interés agronómico, el trigo y la cebada. Se pretendía estudiar por un lado el mecanismo de recombinación homóloga en estos cereales, a la vez que se propuso la caracterización molecular del complejo MRN como un importante sistema genético implicado en diferentes aspectos de los procesos de reparación de roturas y recombinación del ADN.

Las conclusiones derivadas de estos trabajos se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Se ha puesto a punto una tecnología eficiente de transformación en cebada por medio de la infección con *Agrobacterium* de embriones inmaduros, mediante la cual se han obtenido formas transgénicas para las construcciones pAR-ISceI, pIU.GUS y pDGU.US. Los cruzamientos entre las plantas homocigotas para la primera construcción y las plantas homocigotas para las construcciones deladoras permitirán reproducir el análisis controlado de la frecuencia y del mecanismo de recombinación homóloga en un cereal, semejante al llevado a cabo en *Arabidopsis*.
2. Se ha llevado a cabo el aislamiento y la caracterización de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1* en trigo. Esta caracterización demuestra la existencia de un solo gen por genoma, y un elevado grado de conservación de los genes homeólogos entre los distintos genomas A, B y D de trigo, lo cual es reflejo de su importante papel en el mantenimiento de la integridad del genoma.
3. Mediante la utilización de FISH se han localizado el locus *Rad50* en el brazo corto de los cromosomas del grupo de homología 5 de trigo. La posición de este locus es subproximal respecto al locus para el ADN ribosomal 5S. Esta localización se confirmó mediante el análisis por PCR de dos líneas nulitetrasómicas para los cromosomas del grupo de homología 5.
4. El estudio de la expresión de estos genes mediante PCR cuantitativa ha mostrado que los niveles de expresión global de los genes *Mre11*, *Rad50* y *Nbs1* son similares en las especies diploides y en la especie tetraploide estudiadas. La especie hexaploide *Triticum aestivum* presenta un nivel más elevado de expresión

Conclusiones

para los tres genes pudiendo estar relacionado con la mayor necesidad de control de los procesos de recombinación homóloga al presentar tres juegos de cromosomas homeólogos.

5. La expresión del gen *Nbs1* en meiosis en trigo es muy superior a la de *Mre11* y *Rad50*, siendo a su vez similar en estos dos últimos casos. Este incremento en la expresión se puede atribuir a la función que NBS1 desarrolla de forma individual sin formar parte del complejo MRN, participando en una importante ruta de señalización del daño en el ADN, así como en la localización de MRE11 y RAD50 en las zonas de rotura. A su vez los similares niveles de expresión encontrados para *Mre11* y *Rad50* concuerdan con el hecho de que las proteínas resultantes de la expresión actúan siempre juntas formando parte del complejo M₂R₂ o MRN.
6. Se ha modificado la técnica original de SSCP con el fin de simplificarla y mejorar su eficiencia, sustituyendo el marcaje radiactivo por fluorescencia y logrando una lectura objetiva y automática empleando para ello un analizador genético.
7. Mediante la técnica de SSCP modificada se ha visto que la expresión relativa de los genes homeólogos *Mre11* y *Nbs1* del genoma B está disminuida en las especies poliploides de trigo, lo que supone una regulación de la expresión de estos genes tras la aparición de estas especies por procesos de hibridación y posterior duplicación cromosómica, que probablemente tuvo lugar tras el primer suceso de hibridación que dio lugar a la especie tetraploide *T. turgidum*. En el caso del gen *Rad50* no se han detectado diferencias de expresión entre los genes homeólogos.
8. La formación del complejo MRN para la realización de sus funciones celulares implica la interacción entre proteínas MRE11 para formar homodímeros, así como la interacción de ésta con RAD50 para dar lugar al heterotetrámero M₂R₂. Mediante el análisis de doble híbrido se ha visto que estas interacciones son independientes del genoma, interaccionando de igual forma proteínas procedentes de la expresión de los genes homeólogos de los tres genomas A, B y D del trigo, probablemente debido al alto grado de conservación entre todos ellos.

9. En ningún caso se ha detectado interacción para la formación de homodímeros RAD50-RAD50 ni NBS1-NBS1, así como agregados MRE11-NBS1 ni NBS1-RAD50. Estos resultados parecen demostrar que la formación de los complejos MRN dependen no sólo de la presencia de las proteínas ensayadas, enfrentadas de dos en dos, sino de otros factores no aportados por los ensayos de doble híbrido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams KL. (2007)** Evolution of duplicate gene expression in polyploidy and hybrid plants. *J Hered* 98(2):136-141.
- Adams KL, Cronn R, Percifield R, and Wendel JF. (2003)** Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(8):4649-4654.
- Akutsu N, Iijima K, Hinata T, and Tauchi H. (2007)** Characterization of the plant homolog of Nijmegen breakage syndrome 1: Involvement in DNA repair and recombination. *Biochemical Biophys Res Commun* 353(2):394-398.
- Anderson DE, Trujillo KM, Sung P, and Erickson HP. (2001)** Structure of the Rad50-Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *J Biol Chem* 276(40):37027-37033.
- Appels R, and Honeycut RL. (1986)** rDNA evolution over a billion year. *DNA systematics*. S.K. Dutta (Ed). CRC Press, FL, 81-125.
- Arumugam N, Gupta V, Jagannath A, and Mukhopadhyay A. (2007)** A passage through in vitro culture leads to efficient production of marker-free transgenic plants in *Brassica juncea* using the Cre-loxP system. *Transgenic Res* 16(6):703-712.
- Assenmacher N, and Hopfner KP. (2004)** MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113(4):157-166.
- Beetham PR, Kipp PB, Sawychy XL, Arntzen CJ, and May GD. (1999)** A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(15):8774-8778.
- Blanc G, Hokamp K, and Wolfe KH. (2003)** A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Res* 13(2):137-144.
- Borde V. (2007)** The multiples roles of Mre11 complex for meiotic recombination. *Chromosome Res* 15(5):551-563.
- Bowers J, Chapman BA, Rong J, and Paterson AH. (2003)** Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422(6930):433-438.
- Branda CS, and Dymecki SM. (2004)** Talking about a revolution: the impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6(1):7-28.
- Bray CM, and West CE. (2005)** DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol* 168(3):511-528.
- Britt AB, and May GD. (2003)** Re-engineering plant gene targeting. *TRENDS Plant Sci* 8(2):90-95.
- Cabrera A, Martín A, and Barro F. (2002)** *In-situ* comparative mapping (ISCM) of *Glu-1* loci in *Triticum* and *Hordeu*. *Chromosome Res* 10(1):49-54.

- Cermeño MC, Orellana J, Santos JL, and Lacadena JR. (1984)** Nucleolar organizer activity in wheat, rye and derivatives analyzed by a silver-staining procedure. *Chromosoma (Berlin)* 89(5):370-376.
- Cermeño MC, Orellana J, Santos JL, and Lacadena JR. (1984)** Nucleolar activity and competition (amphiplasty) in the genus *Aegilops*. *Heredity* 53(3):603-611.
- Chamankhah M, and Xiao W. (1999)** Formation of the yeast Mre11-Rad50-Xrs2 complex is correlated with DNA repair and telomere maintenance. *Nucleic Acids Res* 27(10):2072-2079.
- Chantret N, Salse J, Sabot F, Rahman S, Bellec A, Laubin B, Dubois I, Dossat C, Sourdille P, Joudrier P, Gautier MF, Cattolico L, Beckert M, Aubourg S, Weissenbach J, Caboche M, Bernard M, Leroy P, and Chalhoub B. (2005)** Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploidy wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* 17(4):1033-1045.
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, and Wan Y. (1997)** Genetinc transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115(3):971-980.
- Ciaffi M, Paolacci AR, D'Aloisio E, Tanzarella OA, and Porceddu E. (2006)** Cloning and characterization of wheat PDI (protein disulfide isomerase) homoeologous genes and promoter sequences. *Gene* 366(2):209-218.
- Cotsaftis O, and Guiderdoni E. (2005)** Enhancing gene targeting efficiency in higher plants: rice is on the move. *Transgenic Res* 14(1):1-14.
- Cronn RC, and Adams KL. (2003)** Quantitative analysis of transcript accumulation from genes duplicated by polyploidy using cDNA-SSCP. *Biotechniques* 34(4):726-734.
- Cuadrado A. (1994)** Análisis genético mediante hibridación "in situ" y bandeo-C en Triticale. *Tesis doctoral, Universidad de Alcalá*.
- Cuadrado A, and Jouve N. (2007a)** The non-random distribution of long clusters of all possible classes of tri-nucleotide repeats in barley chromosomes. *Chromosome Res* 15 (6):711-720.
- Cuadrado A, and Jouve N. (2007b)** Similarities in the chromosomal distribution of AG and AC repeats within and between *Drosophila*, human and barley chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 119(1-2):91-99.
- Cuadrado A, and Schwarzacher T. (1998)** The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* 107(8):587-594.
- Cuadrado A, Schwarzacher T, and Jouve N. (2000)** Identification of different chromatin classes in wheat using in situ hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. *Theor Appl Genet* 101(5-6):711-717.
- D'Amours D, and Jackson SP. (2002)** The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(5):317-327.

- De Bustos A, and Jouve N. (2003)** Characterization and analysis of new HMW-glutenin alleles encoded by Glu-R1 locus of *Secale cereale*. *Theor Appl Genet* 107(1):74-83.
- De Bustos A, and Jouve N. (2006)** Characterisation and phylogenetic analysis of the genes coding for high molecular weight glutenin subunits in three diploid species of Aegilops. *Int J Plant Sci* 167(2):359-366.
- De Bustos A, Pérez R, and Jouve N. (2007)** Characterization of the gene *Mre11* and evidence of silencing after polyploidization in *Triticum*. *Theor Appl Genet* 114(6):985-999.
- De Bustos A, Rubio P, and Jouve N. (2000)** Molecular characterisation of the inactive allele of the gene Glu-A1 and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenin subunits of wheat. *Theor Appl Genet* 100(7):1085-1094.
- De Bustos A, Rubio P, and Jouve N. (2001)** Characterisation of two gene subunits on the 1R chromosome of rye as orthologs of each the Glu-1 genes of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 103(5):733-742.
- De Jager M, Van Noort J, Van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, and Wyman C. (2001)** Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 8(5):1129-1135.
- De Jong JH, Fransz P, and Zabel P. (1999)** High resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trends Plant Sci* 4(7):258-263.
- Desai-Mehta A, Cerosaletti KM, and Concannon P. (2001)** Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol* 21(6):2184–2191.
- Dolganov GM, Maser RS, Novikov A, Tosto L, Chong S, Bressan DA, and Petrini JHJ. (1996)** Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* 16(9):4832-4841.
- Dubcovsky J, and Dvorak J. (2007)** Genome plasticity a key factor in the success of polyploidy wheat under domestication. *Science* 316(5833):1862-1866.
- Dvorak J, di Terlizzi P, Zhang HB, and Resta P. (1993)** The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36():21-31.
- Feldman M, Galili G, and Levy A. (1986)** Genetic and evolutionary aspects of allopolyploidy in wheat. *The Origin and Domestication of Cultivated Plants* 83-100. Elsevier, Amsterdam.
- Feldman M, and Levy AA. (2005)** Allopolyploidy-a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenet Genome Res* 109(1-3):250-258.
- Furuse M, Nagase Y, Tsubouchi H, Murakami-Murofushi K, Shibata T, and Ohta K. (1998)** Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J* 17(21):6412-6425.
- Gallego ME, and White CI. (2000)** RAD50 function is essential for telomere maintenance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(4):1711-1716.

- Gerlach WL, and Dyer TA. (1980)** Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 8(21):4851-4865.
- He P, Friebe BR, Gill BS, and Zhou J-M. (2003)** Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol Biol* 52(2):401-414.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Ananthawat-Jonsson T, Leitch AR, Shi M, Leitch IJ. (1991)** In situ hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3():109-115.
- Hohe A, and Reski R. (2003)** A tool for understanding homologous recombination in plants. *Plant Cell Rep* 21(12):1135-1142.
- Hohn B, and Puchta H. (2003)** Some like it sticky: targeting of the rice gene *Waxy*. *TRENDS Plant Sci* 8(2):51-53.
- Hopfner K-P, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BAL, Karcher A, Henderson B, Bodmer J-L, McMurray CT, Carney JP, Petrini JHJ, and Tainer JA. (2002)** The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418(6897):562-566.
- Hopfner K-P, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, and Tainer JA. (2000)** Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101(7):789-800.
- Hopfner K-P, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP, and Tainer JA. (2001)** Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105(4):473-485.
- Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, and Haselkorn R. (2002)** Genes encoding plastid acyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploidy wheat. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(12):8133-8138.
- Hughes AL. (1994)** The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc Biol Sci* 256(1346):119-124.
- Iida S, and Terada R. (2005)** Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants. *Plant Mol Biol* 59(1):205-219.
- Johnson JC, and Bhawe M. (2004)** Molecular characterisation of the protein disulphide isomerase genes of wheat. *Plant Sci* 167(3):397-410.
- Johzuka K, and Ogawa H. (1995)** Interaction of Mre11 and Rad50: Two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139(4):1521-1532.
- Jones HD. (2005)** Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *J Cereal Sci* 41(2):137-147.
- Jones HD, Doherty A, and Wu H. (2005)** Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods* 1:5.

- Kawaura K, Mochida K, and Ogihara Y. (2005)** Expression profile of two storage-protein gene families in hexaploid wheat revealed by large-scale analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiol* 139(4):1870-1880.
- Khrustaleva LI, and Kik C. (2001)** Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *Plant J* 25(6):699-707.
- Kobayashi J. (2004)** Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA double-strand breaks: NBS1 binds to γ -H2AX through FHA/BRCT domain. *J Radiat Res* 45(4):473-478.
- Kobayashi J, Antoccia A, Tauchi H, Matsuura S, and Komatsu K. (2004)** NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9):855-861.
- Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K-I, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K, and Komatsu K. (2002)** NBS1 localizes to γ -H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* 12(21):1846-1851.
- Kochevenko A, and Willmitzer L. (2003)** Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiol* 132(1):174-184.
- Komatsu K, Antoccia A, Sakamoto S, Kobayashi J, Matsuura S, and Tauchi H. (2007)** NBS1 and MRE11 associate for responses to DNA double-strand breaks. *International Congress Series* 1299:158-163.
- Koumbaris GL, and Bass HW. (2003)** A new single-locus cytogenetic mapping system for maize (*Zea mays* L.): overcoming FISH detection limits with marker-selected sorghum (*S. propinquum* L.) BAC clones. *Plant J* 35(5):647-659.
- Kumar S, Allen GC, and Thompson WF. (2006)** Gene targeting in plants: fingers on the move. *TRENDS Plants Sci* 11(4):159-161.
- Lacadena JR, Cermeño MC, Orellana J, and Santos JL. (1988)** Nucleolar competition in *Triticeae*. *Kew Chromosome Conference III (edited by P.E. Brandham), HMSO, London, pp. 151-165.*
- Lavin MF. (2007)** ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26(56):7749-7758.
- Lee J-H, and Paull TT. (2004)** Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 304(5667):93-96.
- Li J, Hsia A-P, and Schnable PS. (2007)** Recent advances in plant recombination. *Curr Opin Plant Biol* 10(2):131-135.
- Li Z, Xing A, Moon BP, Burgoyne SA, Guida AD, Liang H, Lee C, Caster CS, Barton JE, Klein TM, and Falco SC. (2007)** A Cre/*loxP*-mediated self activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants. *Plant Mol Biol* 65(3):329-341.

- Livak KJ, and Schmittgen TD. (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta_T}$ method. *Methods* 25(4):402-408.
- Matthews PR, Wang M-B, Waterhouse PM, Thornton S, Fieg SJ, Gubler F, and Jacobsen JV. (2001)** Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent “twin T-DNA” on a standart *Agrobacterium* transformation vector. *Mol Breeding* 7(3):195-202.
- Moncalian G, Lengsfeld B, Bhaskara V, Hopfner K-P, Karcher A, Alden E, Tainer JA, and Paull TT. (2004)** The Rad50 signature motif: essential to ATP binding and biological function. *J Mol Biol* 335(4):937-951.
- Moreno FJ, Rodrigo RM, and García-Herdugo G. (1990)** Ag-NOR proteins and rDNA transcriptional activity in plant cells. *J Histochem Cytochem* 38(12):1879-1887.
- Moreno-Herrero F, de Jager M, Dekker NH, Kanaar R, and Wyman C. (2005)** Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* 437(7057):440-443.
- Mukai Y, Friebe B, Hatxchett JH, and Gill BS. (1991)** Physical mapping of the 18S-26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. *Chromosoma*, 100(2):71-78.
- Navashin MS (1928)** Amphilastic - eine neue Karyologische Erscheinun. *Proc Int Conf Genetics* 5:1148-1152.
- Okuzaki A, and Toriyama K. (2004)** Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep* 22(7):509-512.
- Olson E, Nievera CJ, Lee AY-L, Chen L, and Wu X. (2007)** The Mre11/Rad50/Nbs1 complex acts both upstream and downstream of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related protein (ATR) to regulate the S-phase checkpoint following UV treatment. *J Biol Chem* 282(31):22939-22952.
- Orel N, Kyryk A, and Puchta H. (2003)** Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J* 35(5):604-612.
- Paterson AH, Bowers JE, and Chapman BA. (2004)** Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc Natl Acad Sci* 101(26):9903-9908.
- Paull TT, and Gellert M. (1998)** The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 1(7):969-979.
- Paull TT, and Gellert M. (1999)** Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 13(10):1276-1288.
- Petersen G, Seberg O, Yde M, and Berthelsen K. (2006)** Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol Phylogenet Evol* 39(1):70-82.

- Peterson DG, Lapitan NLV, and Stack SM. (1999)** Localization of single- and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics* 152(1):427-439.
- Petrini JHJ, Walsh ME, DiMare C, Chen X-N, Korenberg JR, and Weaver DT. (1995)** Isolation and characterization of the human *MRE11* homologue. *Genomics* 29(1):80-86.
- Pierce AJ, Hu P, Han M, Ellis N, and Jasin M. (2001)** Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev* 15(24):3237-3242.
- Puchta H. (1999)** Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics* 152(3):1173-1181.
- Puchta H. (2003)** Towards the ideal GMP: homologous recombination and marker gene excision. *J Plant Physiol* 160(7):743-754.
- Puchta H. (2005)** The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* 56(409):1-14.
- Puchta H, and Hohn B. (2005)** Green light for gene targeting in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(34):11961-11962.
- Puchta H, Dujon B, and Hohn B. (1993)** Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res* 21(22):5034-5040.
- Puchta H, Dujon B, and Hohn B. (1996)** Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(10):5055-5060.
- Puizina J, Siroky J, Mokros P, Schweizer D, and Rihaa K. (2004)** Mre11 deficiency in *Arabidopsis* is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *Plant Cell* 16(8):1968-1978.
- Ream TS, Strobel J, Roller B, Auger DL, Kato A, Halbrook C, Peters EM, Theuri J, Bauer MJ, Addae P, Dioh W, Staub JM, Gilbertson LA, and Birchler JA. (2005)** A test for ectopic exchange catalyzed by Cre recombinase in maize. *Theor Appl Genet* 111(2):378-385.
- Reiss R, Klemm M, Kosak H, and Schell J. (1996)** RecA protein stimulates homologous recombination in plants. *Proc Natl Acad Sci* 93(7):3094-3098.
- Saar K, Chrzanoska KH, Stumm M, Jung M, Nürnberg G, Wienker TF, Seemanová E, Wegner R-D, Reis A, and Sperling K. (1997)** The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen Breakage Syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 60(3):605-610.
- Sadder MT, Ponelies N, Born U, and Weber G. (2000)** Physical localization of single-copy sequences on pachytene chromosomes in maize (*Zea mays* L.) by chromosome *in situ* suppression hybridization. *Genome* 43(6):1081-1083.

- Sauer B. (1998)** Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14(4):381-392.
- Schuermann D, Molinier J, Fritsch O, Hohn B. (2005)** The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet* 21(3):172-181.
- Schwarzacher T, Leitch AT, Bennett MD, Heslop-Harrison JS. (1989)** In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot* 64(3):315-324.
- Schwarzacher HG, Mikersaar AV, and Schnedl W. (1978)** The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Electron and light-microscopic studies on human cells in interphase, mitosis and meiosis. *Cytogenet Cell Genet* 20(1-6):24-39.
- Semighini CP. (2003)** Different roles of the Mre11 complex in the DNA damage response in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 48(6):1693-1709.
- Shaked H, Melamed-Bessudo C, and Levy AA. (2005)** High-frequency gene targeting in *Arabidopsis* plants expressing the yeast RAD54 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(34):12265-12269.
- Shalev G, Sitrit Y, Avivi-Ragolski N, Lichtenstein C, and Levy AA. (1999)** Stimulation of homologous recombination in plants by expression of the bacterial resolvase RuvC. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(13):7398-7402.
- Sharp PJ, Desai S, and Gale MD. (1988)** Isoenzyme variation and RFLPs at the β -amylase loci in wheat. *Theor Appl Genet* 76():691-699.
- Shrawat AK, Becher D, Lörz H. (2007)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley. *Plant Science* 172(2):281-290.
- Shrawat AK, and Lörz H. (2006)** *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnol J* 4(6):575-603.
- Shrivastav M, De Haro LP, and Nickoloff JA. (2008)** Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18(1):134-147.
- Siebert R, and Puchta H. (2002)** Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell* 14(5):1121-1131.
- Simillion C, Vandepoele K, Van Montagu MC, Zabeau M, and Van de Peer Y. (2002)** The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21):13627-13632.
- Sommerville J. (1985)** Cell biology: organizing the nucleolus. *Nature (London)* 318(6045):410-411.
- Sreekala C, Wu L, Gu K, Wang D, Tian D, and Yin Z. (2005)** Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system. *Plant Cell Rep* 24(2):86-94.

- Symington LS. (2002)** Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(4):630-670.
- Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, Matsuura S, Nakamura A, Shiraishi T, Ito E, Masnada D, Delia D, and Komatsu K. (2001)** The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50/hMRE11/NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem* 276(1):12-15.
- Tauchi H, Matsuura S, Kobayashi J, Sakamoto S, and Komatsu K. (2002)** Nijmegen breakage syndrome gene, *NBS1*, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene* 21(58):8967-8990.
- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, and Brettell R. (1997)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J* 11(6):1369-1376.
- Travella S, Ross SM, Harden J, Everett C, Snape JW, and Harwood WA. (2005)** A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Rep* 23(12):780-789.
- Trujillo KM, and Sung P. (2001)** DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50-Mre11 complex. *J Biol Chem* 276(38):35458-35464.
- Usui T, Ohta T, Oshiumi H, Tomizawa J-I, Ogawa H, and Ogawa T. (1998)** Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* 95(5):705-716.
- Uziel T, and Lerenthal Y. (2003)** Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22(20):5612-5621.
- Van den Bosch M, Bree RT, and Lowndes NF. (2003)** The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep* 4(9):844-849.
- Van Gent DC, and Van der Burg M. (2007)** Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* 26(56):7731-7740.
- Vannier JB, Depeiges A, White C, and Gallego ME. (2006)** Two roles for Rad50 in telomere maintenance. *EMBO J* 25(19):4577-4585.
- Verweire D, Verleyen K, de Buck S, Claeys M, and Angenon G. (2007)** Marker-free transgenic plants through genetically programmed auto-excision. *Plant Physiol* 145(4):1220-1231.
- Wang C-JR, Harper L, and Cande Z. (2006)** High-resolution single-copy gene fluorescence in situ hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. *Plant Cell* 18(3):529-544.
- Wang J, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, and Chen ZJ. (2006)** Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* 167(4):1961-1973.

Waterworth WM, Altun C, Amstrong SJ, Roberts N, Dean PJ, Young K, Well CF, Bray CM, and West CE. (2007) Nbs1 is involved in DNA repair and plays a synergistic role with ATM in mediating meiotic homologous recombination in plants. *Plant J* 52(1):41-52.

Wendel JF. (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol* 42(1):225-249.

Weterings E, and Chen DJ. (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 18(1):114-124.

Williams RS, and Tainer JA. (2007) Learning our ABCs: Rad50 directs MRN repair functions via adenylate kinase activity from the conserved ATP binding cassette. *Mol Cell* 25(6):789-791.

Williams RS, Williams JS, and Tainer JA. (2007) Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signalling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* 85(4):509-520.

Wiltzius JJ, Hohl M, Fleming JC, and Petrini JH. (2005) The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* 12(5):403-407.

Wirth D, Gama-Norton L, Riemer P, Sandhu U, Schucht R, and Hauser H. (2007) Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Curr Opin Biotechnol* 18(5):411-419.

Wright DA, Townsend JA, Winfrey Jr RJ, Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky PM, Hall BD, Jondle MD, and Voytas DF. (2005) High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J* 44(4):693-705.

Wu H, Sparks C, Amoah B, and Jones HD. (2003) Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep* 21(7):659-668.

Xiao Y-L, and Peterson T. (2000) Intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis* induced by a maize transposon. *Mol Gen Genet* 263(1):22-29.

You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, and Russell P. (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 23(13):5363-5379.

Zohary D, and Feldman M. (1962) Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Evolution* 16(1):44-61.

*Anexo I – AMPLIACIÓN DE MATERIALES Y
MÉTODOS*

ANEXO I – AMPLIACIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS

I.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Se partió de hojas jóvenes que fueron pulverizadas en morteros, congelando previamente el material con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se disolvió en tampón de lisis (1ml de tampón de lisis/100mg de hoja fresca) y a continuación se incubó en un baño a 50°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se hizo una primera extracción con fenol/cloroformo-isoamílico, y posteriormente otra extracción con cloroformo-isoamílico. Seguidamente se precipitaron los ácidos nucleicos añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto frío que fueron posteriormente lavados con etanol 70% (v/v). Se dejó secar el precipitado y a continuación se disolvió con el tampón TE. Posteriormente se realizó el tratamiento con ARNasa (100 ng/μl) durante 30 minutos a 37°C, y con proteinasa K (100 ng/μl) y SDS (0,5%) durante una hora a 50°C. Se repitieron las dos extracciones con fenol/cloroformo-isoamílico, precipitando el ADN con etanol absoluto frío y acetato sódico 0,3 M. Por último se lavó el ADN con etanol 70% (v/v), se dejó secar y se disolvió en un volumen determinado de tampón TE.

Alternativamente, para identificar mediante PCR las plantas transgénicas obtenidas tras los experimentos de transformación con *Agrobacterium*, se siguió un protocolo de extracción rápida en el que no se realizó la primera precipitación con etanol, de forma que tras la extracción con cloroformo, se continuó con el tratamiento con ARNasa (Roche). En este caso se redujo el material de partida lo que permitió trabajar con volúmenes menores y manejar un gran número de muestras a la vez.

Tampón de lisis		Tampón TE	
Tris·HCl pH=8	100 mM	Tris·HCl pH=8	10 mM
NaCl	100 mM	EDTA pH=8	1 mM
EDTA pH=8	50 mM		
➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C			
SDS	2% (p/v)		
➤ En el momento de su uso se añade:			
Proteinasa K	100 μg/ml		

I.2. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El tampón en el que se llevaron a cabo estas electroforesis fue tampón TAE, y se trabajó con geles de agarosa de concentraciones entre 0,8 y 1,8 % (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN con que se trabajaba en cada caso. Los voltajes a los que se llevaron a cabo las electroforesis están entre 1-5 V/cm.

Se añadió un tampón de carga a las muestras antes de cargarlas en el gel, y posteriormente se tiñeron los geles con una solución de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se empleó *1Kb plus DNA ladder* (Invitrogen).

Tampón TAE		Tampón de Carga 6X	
Tris·HCl pH=8	40 mM	Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
EDTA pH=8	1 mM	Xilencianol	0,25% (p/v)
Ácido acético	0,11% (v/v)	Ficoll	30% (v/v)

Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes

Los geles desnaturalizantes de agarosa se prepararon al 1% (p/v) en tampón MOPS con formaldehído 6,7% (v/v). Se utilizó agua DEPC para preparar todas las soluciones que se empleadas en el proceso.

H ₂ O-DEPC		Tampón de desnaturalización 4X	
DEPC	0,1 % (v/v)	Formamida (desionizada)	10 ml
➤ Agitar durante 16 horas		Folmaldehído 37%	3,5 ml
➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C		MOPS 10X	1X
		Br. de etidio (stock 10mg/ml)	1 µl
		Azul bromofenol (0,25% p/v)	1 µl
		➤ Guardar a -20°C	
		➤ Se mantiene estable 6 meses	
Tampón MOPS 10x			
MOPS	0,4 M		
Acetato sódico	0,1 M		
EDTA	0,01 M		
➤ Ajustar pH=7 (NaOH-DEPC)			
➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C			
➤ Guardar a 4°C protegido de la luz			

El tampón de desnaturalización se añadió a las muestras justo antes de cargar el gel, se calentó durante 10 minutos a 65°C y se dejó enfriar 2 minutos en hielo. La electroforesis se realizó utilizando MOPS 1X como tampón de cubeta, a un voltaje no superior a 5V/cm.

Electroforesis de ADN en geles de acrilamida

Para el análisis de fragmentos de pequeño tamaño mediante electroforesis así como para la separación de fragmentos con pocas bases de diferencia de tamaño se sustituyó el uso de geles de agarosa por geles de acrilamida. Se empleó el producto *Acrylamide/bis-acrylamide electrophoresis reagent* (Sigma).

Como tampón de electroforesis se empleó TBE y se trabajó con geles de una concentración de 7% de acrilamida. El voltaje empleado fue de 120V y se utilizó el mismo tampón de carga que en el caso de los geles no desnaturalizantes de agarosa.

Tampón TBE		Gel de Acrilamida al 7% (en TBE)	
Tris·HCl	90 mM	Acrilamida/Bisacril. (40%)	7%
Ácido bórico	89 mM	APS (10%)	8,3 ml/l
EDTA	2 mM	TEMED	833 µl/l

I.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La concentración de soluciones de ácidos nucleicos se midió utilizando un espectrofotómetro *GeneQuant pro* (Amersham). En el caso de cantidades pequeñas se utilizó el espectrofotómetro (Nanodrop) *ND-1000 Spectrophotometer* (Amersham).

La cuantificación de fragmentos de ADN de pequeño tamaño también se llevó a cabo en geles de agarosa usando el marcador de peso molecular *SmartLadder* (Eurogentec), que permite realizar una cuantificación aproximada de las muestras cargadas en un gel por comparación de las intensidades de las bandas tras tinción con bromuro de etidio.

I.4. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Vectores de Clonación

Los vectores empleados para la clonación de fragmentos de ADN se recogen en la siguiente tabla:

Nombre del vector	Organismo transformado	Características	Procedencia
pBlueScript sk ⁻	<i>Escherichia coli</i>	Amp ^r , lacZ	Estratagen
pGEM-T easy	<i>Escherichia coli</i>	Amp ^r , lacZ	Promega
Sk ⁻ T-vector	<i>Escherichia coli</i>	Amp ^r , lacZ	Estratagen (modif.*)

Clonación de fragmentos de extremos romos

Los fragmentos de extremos romos se clonaron en el vector pBlueScript sk⁻ cortado con *EcoRV*.

Preparación del plásmido: Se digirieron 5 µg de vector con 20 U de la enzima *EcoRV* y tampón 1X, durante 16 horas a 37°C, al cabo de las cuales la reacción es purificada usando el Kit High Pure PCR product purification kit (Roche). Es muy importante comprobar tras este paso que todas las moléculas han sido cortadas. A continuación se realiza una reacción de defosforilación con la enzima *Shrimp alkaline phosphatase* (USB). Para ello se incubó el plásmido ya digerido y purificado con 1U de la enzima fosfatasa y el tampón 1X, durante 1 hora a 37°C, sometiendo posteriormente la mezcla a 65° durante 15 minutos para la inactivación de la enzima. La mezcla se purifica de nuevo y se obtiene el plásmido que posteriormente se usará en las reacciones de ligación, dejándose normalmente a una concentración de 50 ng/µl.

Preparación del inserto: Ya que el plásmido ha sido defosforilado, es necesario que el inserto que se quiere clonar esté fosforilado, para lo cual se emplea la enzima *T4 polynucleotide kinase* (Takara). Se incubó el inserto purificado (1-50 pmol) con 5 U de enzima, tampón 1X, ATP 1 mM, DTT 5 mM y espermidina 150 µM, durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se purifica el inserto.

Ligación: En la ligación de fragmentos, tanto con extremos romos como cohesivos, se empleó el kit *DNA ligation Kit <Mighty Mix>* (Takara), siguiendo las indicaciones del protocolo suministrado en el kit. Normalmente se emplearon 25-50 ng de vector (≈12,5-

25 fmol) y 100-200 fmol de inserto. La incubación fue en todos los casos a 16°C durante 1 hora, y los volúmenes de la reacción estaban entre 10-15 µl.

Clonación de fragmentos de extremos cohesivos

Los fragmentos con extremos cohesivos (con un nucleótido extra dATP en 3') se clonaron en los vectores *pGEM-T easy* (Promega), o en el denominado *Sk⁻ T-vector*. Alternativamente, estos fragmentos se convirtieron en fragmentos de extremos romos y se clonaron según el protocolo anterior.

Obtención de Sk⁻ T-vector: El procedimiento de obtención de este vector consistió en la digestión de 5 µg del vector pBlueScript con la enzima de restricción *EcoRV*. El producto de la digestión fue purificado y tras ello se llevó a cabo una reacción para añadir un nucleótido dTTP en los extremos 3', incubando durante 2 horas a 72°C con 2,5 U de taq polimerasa, 1X tampón de la polimerasa y dTTP 2 mM. El producto de la reacción fue finalmente purificado.

Preparación del inserto: Ya que en este caso el vector no ha sido defosforilado, el inserto no necesita ninguna preparación previa a la ligación salvo su purificación.

Ligación: La reacción de ligación fue llevada a cabo de igual forma que en el caso anterior de fragmentos con extremos romos.

Obtención de extremos romos a partir de estos insertos: Para poder ligar los fragmentos amplificados con polimerasas que añaden nucleótidos dATP en 3' en vectores de extremos romos, se empleó la enzima *T4DNA polymerase* (Invitrogen). La reacción consiste en incubar el inserto durante 30 minutos a 16°C con 1,5U de enzima, tampón 1X y 0,2 mM de dNTPs. Posteriormente se inactiva la enzima incubando 10 minutos a 70°C, se purifica la mezcla y se continuaría con el protocolo de clonación de fragmentos de extremos romos con la fosforilación del inserto.

Cultivo y transformación de *E. coli* por choque térmico

Preparación de cultivos: Para el cultivo líquido se tomó como preinóculo una colonia aislada o bien se partió de stock congelado a -80°C en solución Hogness. Se utilizó medio LB (con 50mg/l de ampicilina cuando se trate de bacterias que portan los plásmidos anteriormente descritos) y se permitió el crecimiento del cultivo durante 16 horas a 37°C

Anexo I – Ampliación de Materiales y Métodos

en agitación de 200 rpm, obteniéndose así un cultivo saturado. Para la obtención de un cultivo en fase exponencial de crecimiento se tomó como preinóculo un cultivo saturado y se añadió medio fresco en una proporción 1:25. Se dejó crecer durante 2 horas a 37°C y 200 rpm, y tras este tiempo la O.D._{600nm} debe tener valores entre 0,6-0,8.

Mantenimiento de la cepa: Los stocks de *E. coli* se mantuvieron en solución Hogness a -80°C. Para ello se partió de un cultivo saturado que se centrifugó para obtener un precipitado de células el cual se disolvió en solución Hogness, y tras ser congelado con nitrógeno líquido se almacenó a -80°C. Para un mantenimiento a no tan largo plazo se usaron placas de LB agar que se almacenaron selladas por períodos de hasta dos meses a 4°C.

Solución Hogness		Medio LB	
K₂HPO₄	3,6 mM	Triptona	0,5% (p/v)
KH₂PO₄	1,3 mM	Extracto de levadura	1% (p/v)
Citrato sódico	2 mM	NaCl	0,5% (p/v)
MgSO₄	1 mM	➤ Ajustar el pH=7 (NaOH/HCl)	
Glicerol	4,4% (v/v)	➤ Autoclavar 20 min a 121°C	
		➤ Para medios sólidos añadir:	
		Agar bacteriológico	1,5% (p/v)

Preparación de células competentes: Se obtuvo un cultivo de 100 ml en fase exponencial con valores de O.D._{600nm} entre 0,6 y 0,8, y se detuvo el crecimiento del cultivo dejándolo durante 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 4°C y 2500 rpm al final del cual se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células fue disuelto en 33 ml de tampón RF-I. Se dejó reposar en hielo durante 15 minutos volviéndose a centrifugar 10 minutos a 4°C y 2500 rpm. A continuación se eliminó el sobrenadante y se utilizaron 2 ml del tampón RF-II para disolver las células. Tras reposar 15 minutos en hielo se repartió en alícuotas de 200 µl que se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C para su posterior uso.

Tampón RF-I		Tampón RF-II	
KAc	30 mM	MOPS (stock 0,5M; pH=6,8)	10 mM
KCl	1,2% (p/v)	KCl	0,12% (p/v)
MnCl₂	50 mM	CaCl₂	75 mM
CaCl₂	10 mM	Glicerol	15% (v/v)
Glicerol	15% (v/v)	➤ Ajustar el pH=6,8 (NaOH)	
➤ Ajustar pH=5,8 (ac. acético 0,2M)		➤ Esterilizar por filtración	
➤ Preparar en el momento de usar		➤ Almacenar a 4°C hasta un año	

Transformación por choque térmico: Partiendo de las alícuotas de 200 µl de células competentes se añadió a estas el ADN plasmídico en un volumen no superior a 20 µl. En los casos en que se transformó con una mezcla de ligación se utilizó toda la mezcla sin purificar. Se dejó en hielo durante 15 minutos y posteriormente se les sometió a un choque térmico a 42°C durante 90 segundos. A continuación se dejaron las células en hielo durante 2-3 minutos y pasado este tiempo se les añadió 800 µl de medio SOC tras lo cual se pusieron a crecer 1 hora a 37°C y 700 rpm. Una vez transcurrido este tiempo de crecimiento se sembraron volúmenes de entre 25-200 µl en placas de LB agar y se dejaron incubando en estufa a 37°C durante 18 horas. En este caso, las placas de LB agar fueron suplementadas con ampicilina (50 mg/l), X-Gal (20 mg/l) e IPTG (50 mg/l), lo que permite identificar colonias bacterianas en las que se han introducido plásmidos recombinantes portadores del inserto, ya que los vectores de transformación portan el gen lacZ como delator de la presencia de inserto. De todos ellos habrá que seleccionar aquellos que lleven el inserto deseado.

Medio SOB		Medio SOC	
Tryptona	2% (p/v)	Tryptona	2%
Extracto de levadura	0,5% (p/v)	Extracto de levadura	0,5%
NaCl	580 mg/l	NaCl	580 mg/l
KCl	187 mg/l	KCl	187 mg/l
➤ Ajustar el pH=7 (NaOH)		➤ Ajustar el pH=7 (NaOH)	
➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C		➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C	
MgSO₄ (stock 1M)	5 mM	MgSO₄ (stock 1M)	5 mM
MgCl₂ (stock 1M)	5 mM	MgCl₂ (stock 1M)	5 mM
		Glucosa (stock 1M)	20 mM

Identificación de colonias bacterianas portadoras de plásmidos recombinantes: Ensayo Toothpick

La identificación de los clones bacterianos portadores de la molécula recombinante de interés se llevó a cabo estimando el tamaño del vector presente en cada clon. Para ello se tomó un inóculo de las colonias a analizar y se disolvió en 25 µl de tampón *toothpick*. Las muestras se incubaron a 65°C durante 20 minutos y pasado este tiempo se cargó todo el volumen en un gel de agarosa al 1% (p/v) y se llevó a cabo la electroforesis.

Tampón Toothpick	
NaOH (stock 1N)	0,05 N
EDTA (stock 0,5M; pH=8)	5 mM
SDS (stock 10% v/v)	0,25% (v/v)
Glicerol	30%
Azul de bromofenol (0,4%)	0,01%

I.5. TRANSFORMACIÓN DE TRIGO MEDIADA POR *Agrobacterium*

Cultivo y Transformación de la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*

Preparación de cultivos: Para la obtención de cultivos saturados se partió de una colonia aislada en placa o bien de stock en glicerol como preinóculo y se permitió el crecimiento en un medio LB a 28°C en oscuridad y 200 rpm, hasta alcanzar una O.D._{600nm} cercana a 1,5. A partir de éste se puede obtener un cultivo con las células en fase exponencial de crecimiento. Para ello se toma parte del cultivo saturado y se inocula medio fresco LB en una proporción 1:20, dejando crecer a 28°C y en agitación hasta que se alcanza una O.D._{600nm} entre 0,8-1. Para la obtención de colonias aisladas se utilizaron placas de LB agar y se dejó crecer en una estufa a 28°C durante 2-3 días, hasta que las colonias fueron visibles.

Mantenimiento de la cepa: Los stocks de la cepa AGL1 se mantuvieron indefinidamente a -80°C en solución MgSO₄ 2,5 mM en 60% glicerol. Para su preparación se partió de un cultivo saturado que fue centrifugado 4000 rpm para obtener un precipitado de células y posteriormente fue disuelto con MgSO₄ 10mM y glicerol 80% (v/v) a razón de 1:3. Para su mantenimiento a más corto plazo se usó medio LB-agar y las placas se sellaron y guardaron a 4°C durante varios meses.

Obtención de células electrocompetentes: Para la obtención de células competentes de esta cepa se partió de un cultivo saturado que fue usado como preinóculo para inocular medio fresco LB sin antibióticos en una proporción 1:20. Se dejó crecer hasta que alcanzó una O.D._{600nm} entre 0,8-1 y en este momento se detuvo el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante 5 minutos. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y 4000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se disolvió el precipitado de células en

glicerol 10% (v/v) frío, el mismo volumen de glicerol que el cultivo de partida. Se centrifugó de nuevo durante 15 minutos a 4°C y 4000 rpm. Se volvió a eliminar el sobrenadante y se lavó tres veces con el doble de volumen de glicerol 10% (v/v). Tras el tercer lavado se disolvieron las células en glicerol 10% (v/v), 1 ml de glicerol por 100 ml de cultivo de partida y se repartió todo el volumen en alícuotas de 40 µl que se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Transformación por electroporación: La transformación de *A. tumefaciens* se llevó a cabo mediante electroporación utilizándose para ello el electroporador *E. coli Pulser* (BIO-RAD). Se añadieron 50 ng de ADN plasmídico purificado en un volumen de 15 µl sobre una alícuota de células electrocompetentes. Se pasó la mezcla a una cubeta previamente enfriada y se sometió a un pulso de 1,8 kV. Inmediatamente después se añadió 1 ml de LB y se dejó creciendo 1 hora a 28°C. A continuación se sembró todo el volumen de bacterias en una placa de LB agar con rifampicina (50 mg/l) y gentamicina (60 mg/l). Se dejó crecer en una estufa a 28°C durante 2-3 días hasta que las colonias de *Agrobacterium* fueron visibles.

Transformación de trigo mediada por *Agrobacterium*

Preparación del inóculo de *Agrobacterium tumefaciens*: Se utilizó la cepa de *Agrobacterium* AGL1 transformada previamente con las construcciones de interés. Las bacterias fueron crecidas en medio LB con los antibióticos correspondientes y acetosiringona 200 µM a 28°C, en oscuridad y en agitación a 200 rpm durante 17 horas hasta obtener un cultivo saturado. Una vez que se obtuvo un cultivo saturado se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm y temperatura ambiente. El precipitado de células se disolvió en medio de inoculación, añadiéndose 6 ml de medio de inoculación por cada 15 ml de cultivo original.

Preparación del material vegetal y extracción de embriones: Las semillas se germinaron en placas con papel de filtro humedecido, y una vez germinadas se pasaron las plántulas a tierra. Aproximadamente dos semanas después de la anthesis se recogieron los granos para la transformación. La esterilización de los granos se realizó lavando durante 1 minuto con etanol 70% (v/v), y durante 10 minutos con lejía *Domestos* 10% (v/v) en agitación. Posteriormente se aclaran los granos con agua del grifo esterilizada en autoclave hasta eliminar completamente los restos de lejía.

Anexo I – Ampliación de Materiales y Métodos

La disección de los granos se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, usando una lupa binocular, pinzas y bisturí en una campana de flujo laminar. Se extrajeron con cuidado los embriones seleccionando aquellos con un tamaño entre 2-4 mm y se colocaron en el medio CM4C-pre-cultivo agar de forma que el escutelo quedara en contacto con el medio.

Medio CM4C – Pre-cultivo		Medio de Inoculación	
Sales MS (Duchefa)	4,3 g/l	Sales MS (Duchefa)	0,43 g/l
Vitaminas MS (stock 1000X)	1X	Vitaminas MS (stock 1000X)	1X
Maltosa	4% (p/v)	Maltosa	4% (p/v)
➤ Ajustar el pH=5,8 (KOH)		Glucosa	1% p/v)
Gelrite (agar)	0,2% (p/v)	➤ Ajustar pH=5,8 (KOH)	
➤ Autoclavar 20 min a 121°C		➤ Autoclavar 30 min a 115°C	
➤ Una vez atemperado (50°C) añadir:		➤ Una vez atemperado (50°C) añadir:	
2,4-D	0,5 mg/l	2,4-Diclorofenoxiacético	0,5 mg/l
Picloram	2,2 mg/l	Picloram	2,2 mg/l
Ácido ascórbico	100 mg/l	Ácido ascórbico	100 mg/l
		Acetosiringona	40 mg/l
		Silwet-L77 (stock 8%)	0,02%
Vitaminas MS (1000X)			
Glicina	0,2% (p/v)		
M-inositol	10% (p/v)		
Ácido nicotínico	0,05% (p/v)		
Piridoxina·HCl	0,05 (p/v)		
Tiamina·HCl	0,01% (p/v)		
➤ Esterilizar por filtración			

Pre-cultivo de los embriones: El pre-cultivo de los embriones extraídos se llevó a cabo en medio CM4C-pre-cultivo agar durante un período no inferior a 1 hora, que puede extenderse hasta 24 horas. Durante este tiempo los embriones se mantenían en una cámara de cultivo a 24°C y en oscuridad.

Inoculación y co-cultivo de los embriones: Para la transformación se pusieron los embriones en contacto con una suspensión de *Agrobacterium* en medio de inoculación. Se dejaron durante 3 horas a 24°C en oscuridad, y pasado este tiempo se retiraron los embriones de la suspensión y se colocaron en placas con medio CM4C-co-cultivo agar durante un período de 2 ó 3 días en condiciones de 24°C y oscuridad.

Medio CM4C – Co-cultivo		Medio CM4C – Inducción	
Sales MS	4,3 g/l	Sales MS	4,3 g/l
Vitaminas MS (stock 1000X)	1X	Vitaminas MS (stock 1000X)	1X
Maltosa	4% (p/v)	Maltosa	4% (p/v)
Glucosa	1% (p/v)	➤ Ajustar el pH=5,8 (KOH)	
➤ Ajustar pH=5,8 (KOH)		Gelrite (agar)	0,2% (p/v)
Gelrite (agar)	0,2% (p/v)	➤ Autoclavar 20 min a 121°C	
➤ Autoclavar 30 min a 115°C		➤ Una vez atemperado (50°C) añadir:	
➤ Una vez atemperado (50°C) añadir:		2,4-D	0,5 mg/l
2,4-D	0,5 mg/l	Picloram	2,2 mg/l
Picloram	2,2 mg/l	Ácido ascórbico	100 mg/l
Ácido ascórbico	100 mg/l	Ticarcilina	150 mg/l
Acetosiringona	40 mg/l		

Inducción de formación de callos y selección de embriones transformados: Tras el período de co-cultivo se pasaron los embriones a placas con medio CM4C-inducción agar, y se dejaron en estas placas durante 2-5 días a 24°C y en oscuridad, al cabo de los cuales se pasaron a medio CM4C-inducción agar fresco. A partir de aquí se fue renovando el medio con una periodicidad de 2-3 semanas, hasta la formación de callos.

Regeneración de plántulas y selección de plantas transgénicas: Una vez formados los callos, éstos se pasaron a un medio de regeneración MMSO.2C, en condiciones de 12 horas de luz a 22°C/18°C en oscuridad. Es en este paso en el que se comienza a realizar una selección de los callos transformados, añadiendo al medio el agente selector en cada caso (*Tabla I.1*). Cuando comenzaron a aparecer zonas verdes en los callos, éstos fueron transferidos a un medio MMS.2C, en iguales condiciones de luz y temperatura. En este medio permanecieron hasta que se obtuvieron plántulas de 3-4 cm de altura con raíces, que se pasaron posteriormente a tierra. Las plantas se pasaron a cámaras de cultivo comenzando con un fotoperiodo de 12 horas de luz a 22°C/18°C en oscuridad. Con una periodicidad de 10 días se fue aumentando en 30 minutos las horas de luz hasta llegar a establecer 16 horas de día/8 horas oscuridad.

Construcción	Agente selector	Concentración
pIU.GUS	Higromicina	25 mg/l
pDU.GUS	Higromicina	25 mg/l
pDGU.US	Fosfinotricina	5 mg/l
pAR-ISceI	Kanamicina	35 mg/l

Tabla I.1. Antibióticos de selección usados para las construcciones con las que se transformó el trigo y la cebada, con la concentración a la que se usaron en los medios.

Medio MMSO.2C		Medio MMS.2C	
Sales MS	4,3 g/l	Sales MS	4,3 g/l
Vitaminas MS (1000X)	1X	Vitaminas MS (1000X)	1X
Maltosa	4% (p/v)	Maltosa	4% (p/v)
MES	1% (p/v)	MES	1% (p/v)
➤ Ajustar pH=5,8 (KOH)		➤ Ajustar pH=5,8 (KOH)	
Gelrite (agar)	0,2%	Gelrite (agar)	0,2%
➤ Autoclavar 20 min a 121°C		➤ Autoclavar 20 min a 121°C	
➤ Una vez atemperado (50°C) añadir:		➤ Una vez atemperado (50°C) añadir:	
2,4-D	0,2 mg/l	Ácido ascórbico	100 mg/l
Ácido ascórbico	100 mg/l	Ticarcilina	150 mg/l
Ticarcilina	150 mg/l		

I.6. TRANSFORMACIÓN DE CEBADA MEDIADA POR *Agrobacterium*

El protocolo utilizado para la obtención de plantas transgénicas de cebada mediante la infección de embriones inmaduros con *Agrobacterium tumefaciens* fue el descrito por Tingay y col., (1997) con pequeñas modificaciones.

Preparación del material vegetal: Se germinaron las semillas de cebada en placa sobre un papel de filtro humedecido, y tras la germinación se pasaron las plántulas a tierra. Las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo, en condiciones controladas de luz y temperatura (22°C ,16 horas de luz/18°C, oscuridad). Los granos se recogieron entre 10-15 días tras la anthesis, comprobando previamente que el tamaño de los embriones se encontraba entre 1,5 y 2,5 mm de longitud. En este momento las espigas presentan una coloración más amarillenta por los extremos y el grano aparece duro al tacto. Una vez extraídos los granos se procedió a su esterilización durante un minuto con etanol 70% (v/v) y posteriormente 15 minutos con una solución de lejía *Domestos* al 10% (v/v) en agitación. A continuación se realizó el aclarado de los granos con tres lavados sucesivos de 10 minutos cada uno en agitación: agua estéril pH=3 (HCl), agua destilada estéril y finalmente agua del grifo estéril.

Extracción de embriones: La disección de los granos se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, usando una lupa binocular, pinzas y bisturí en una campana de flujo laminar. Para ello se coloca el grano sobre su cara ventral y se realiza un corte con el bisturí en el

extremo del grano donde se localiza el embrión (extremo que estuvo en contacto con la planta madre). A continuación se presiona suavemente en el centro del grano de forma que el embrión se desliza a través del corte realizado y queda fuera del grano. Se quita el tallo embrionario con cuidado de no romper el escutelo el cual se coloca sobre una placa con medio BCI agar de forma que el surco dejado al eliminar el tallo embrionario quede hacia arriba (*Figura I.1*).

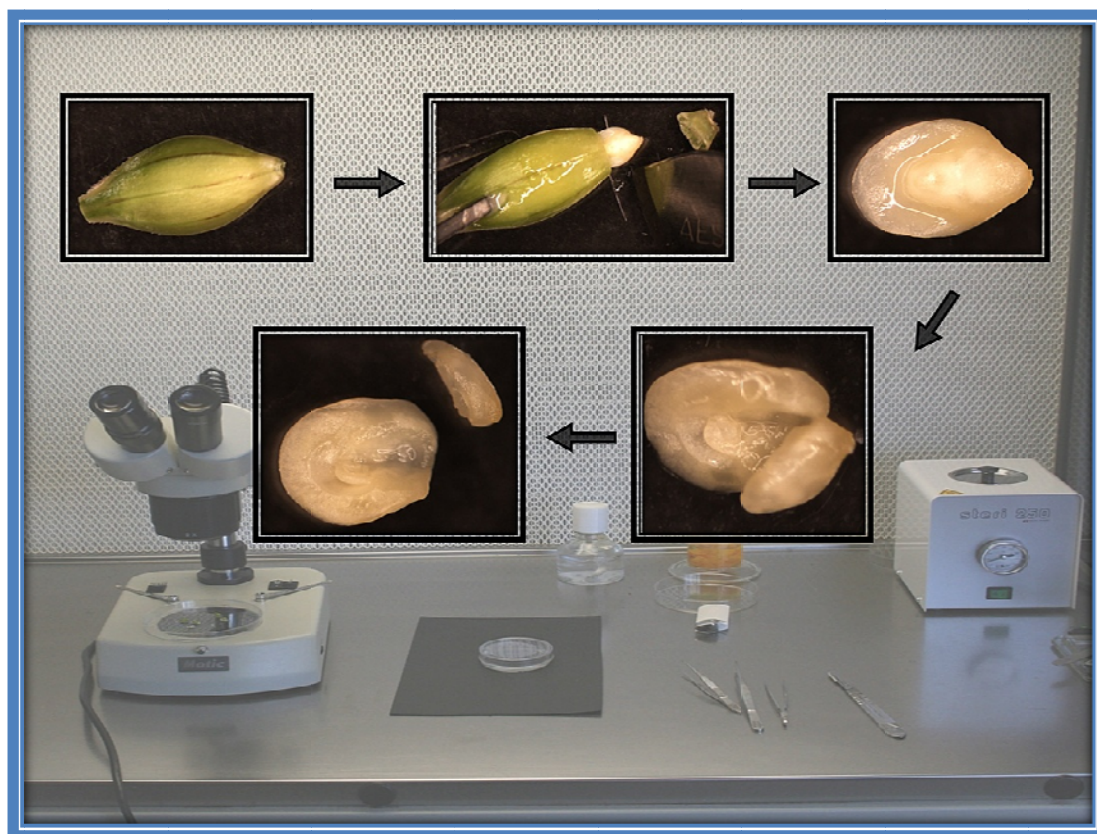


Figura I.1. Disección de un grano de cebada y extracción del embrión. Se muestra cómo se realiza el corte del tallo embrionario dejando un surco en el escutelo.

Preparación del inóculo de *Agrobacterium tumefaciens*: Se utilizó la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* transformada previamente con las construcciones convenientes. Para ello, se permitió el crecimiento de 5 μ l del stock de bacterias en glicerol en 10 ml de medio MG/L, sin selección durante 16 horas a 28°C en oscuridad y agitación a 200 rpm. Pasado este período, cuando la O.D._{600nm} se encontraba entre 1,5-1,7, se cogieron 200 μ l de este cultivo para inocular cada placa de embriones.

Inoculación de los embriones: Una vez extraídos los embriones se colocaron del orden de 30-40 embriones por placa en medio BCI agar, con el surco dejado al quitar el tallo hacia arriba, y se guardaron en oscuridad a 24°C para ser seguidamente inoculados (sin pre-cultivo previo). Cada placa se inoculó con 200 µl del cultivo de *A. tumefaciens* girando en este momento los embriones para que quedasen con el surco hacia abajo. Se dejó un período de co-cultivo de 45 minutos en oscuridad a 24°C. Transcurrido este tiempo se pasaron los embriones a una nueva placa con medio inductor de callos (BCI dicamba) con el surco hacia arriba, dejándose dos días en oscuridad a 24°C. A partir de este momento los embriones se colocaron siempre con el surco hacia arriba.

Medio MG/L		Medio BCI	
Manitol	0,5% (p/v)	Sales MS	4,3 g/l
Ácido L-glutámico	0,1% (p/v)	Tiamina·HCl (stock 1mg/ml)	1 mg/l
KH₂PO₄	250 mg/l	M-inositol	250 mg/l
NaCl	100 mg/l	Hidrolizado de caseína	1 g/l
MgSO₄·7H₂O	100 mg/l	Prolina	690 mg/l
Tryptona	0,5% (p/v)	CuSO₄ (stock 1,248 mg/ml)	1,22 mg/l
Extracto de levadura	0,25% (p/v)	Maltosa	3% (p/v)
➤ Ajustar pH=7 (HCl/NaOH)		➤ Ajustar pH=5,8 (KOH)	
➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C		Gelrite (agar)	0,35% (p/v)
		➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C	

Inducción de formación de callos y selección de embriones transformados: El medio inductor de callos utilizado es el medio BCI suplementado con dicamba (2 mg/l) y ticarcilina (150 mg/l) la cual inhibe el crecimiento de *Agrobacterium*. Además, este medio llevará un agente de selección adecuado en cada caso (*Tabla I.1.*, página I.13). Los embriones se mantuvieron en este medio hasta un total de seis semanas, renovando el medio con una periodicidad de dos semanas, en condiciones de oscuridad y a 24°C. El número de embriones por placa se fue reduciendo en las sucesivas renovaciones ya que en esta primera etapa de inducción de callos el tamaño de los mismos aumenta considerablemente.

Regeneración de plántulas y selección de plantas transgénicas: Una vez finalizado el período de inducción de callos, durante el cual se realiza una selección de los embriones transformados mediante el antibiótico añadido al medio de inducción, los callos fueron pasados a un medio de regeneración de plántulas. Se utilizó el medio FHG agar al que se

añadió 6-benzil-amino-purina (1 mg/l), ticarcilina (150 mg/l) y el agente selector en cada caso.

Medio FHG		Macro-elementos MS (sin NH ₄ NO ₃) 20X	
Micro-elementos MS (100X)	1X	CaCl ₂ ·2H ₂ O	60 mM
Macro-elementos MS (20X)	1X	KH ₂ PO ₄	25 mM
NH ₄ NO ₃ (stock 165 mg/ml)	165 mg/l	KNO ₃	375,8 mM
CuSO ₄ (stock 1,248 mg/ml)	1,22 mg/l	MgSO ₄ ·7H ₂ O	30 mM
M-inositol	100 mg/l		
Tiamina·HCl (stock 1 mg/ml)	400 µg/l		
Glutamina	730 mg		
Maltosa	6,2% (p/v)		
➤ Ajustar pH=5,8 (KOH)			
Gelrite (agar)	0,35%		
➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C			
		Micro-elementos MS 100X	
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	11 µM
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	10 µM
		FeNaEDTA	10 mM
		H ₃ BO ₃	10 mM
		KI	0,5 mM
		MnSO ₄ ·H ₂ O	10 mM
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,1 mM
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,99 mM

En este medio permanecieron un periodo de hasta ocho semanas, en condiciones de 16 horas de luz a 24°C, realizando renovaciones del medio cada dos semanas. Pasado este tiempo se pudieron diferenciar plántulas individuales, que en caso de presentar raíces se pasaron directamente a tierra, o alternativamente se pusieron en un medio para inducir la formación de raíces, utilizándose para ello el medio BCI ½ (medio BCI con todos sus componentes reducidos a la mitad), con ticarcilina (150 mg/l) y el agente selector (*Figura I.2*). Las plántulas pasadas a tierra se mantuvieron en una cámara de cultivo en condiciones de 12 horas de luz a 22°C/18°C por la noche, aumentando en media hora las horas de luz cada 10 días llegando a establecer un régimen de 16 horas de luz a 22°C/8 horas de oscuridad a 18°C.

La selección de plantas transgénicas se llevó a cabo durante los sucesivos pases a los medios con los antibióticos de selección. Posteriormente se comprobó el carácter transgénico de las plantas regeneradas mediante ensayos de PCR y Southern Blot. Los cebadores y sondas utilizados en este caso se describen en el *Anexo II – Oligonucleotidos*.

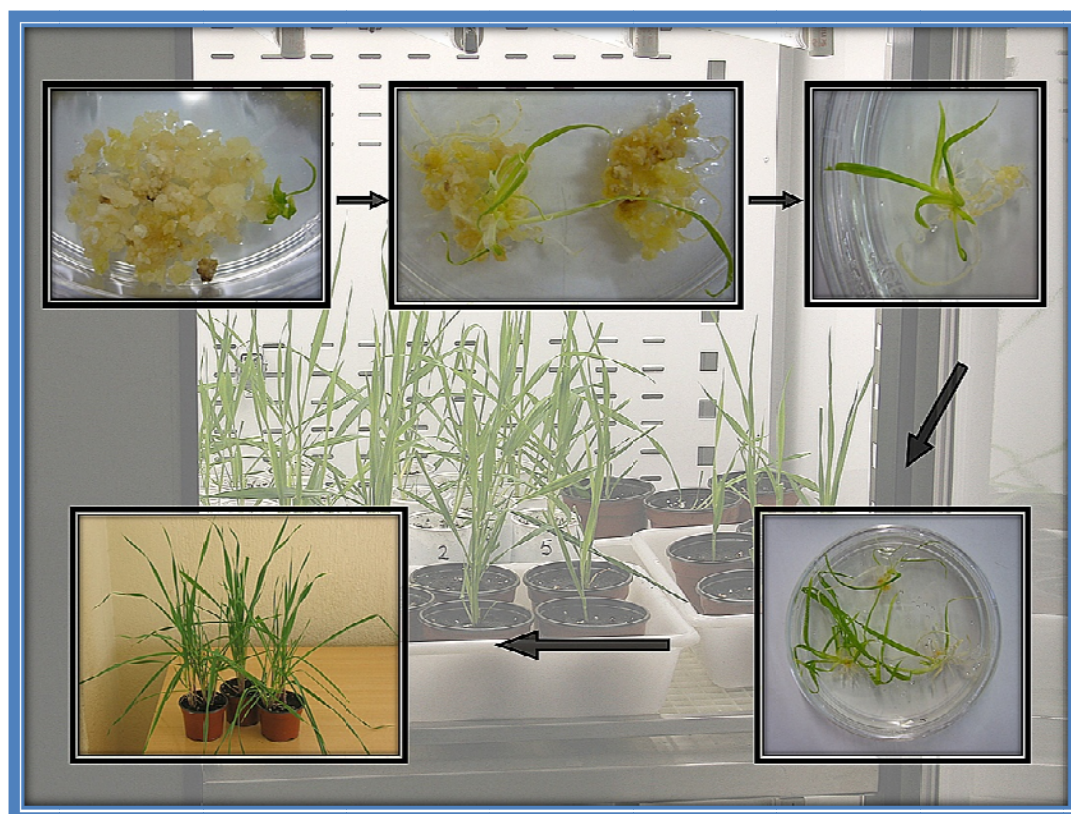


Figura I.2. Desarrollo de callos y regeneración de plántulas. Las dos primeras imágenes muestran callos que comienzan a regenerar plántulas en el medio FHG. Posteriormente las plántulas fueron pasadas a medio $\frac{1}{2}$ BCI y tras la aparición de raíces se colocaron en tierra.

I.7. ENSAYOS DE SOUTHERN BLOT

Se han empleado dos tipos diferentes de membranas en la transferencia de los ácidos nucleicos para realizar los ensayos de Southern blot, membranas con carga y sin carga. Los protocolos son similares en ambos casos, aunque cada uno de ellos se detalla por separado a continuación. El empleo de un tipo u otro de membrana se realizó indistintamente, optando en último lugar por las membranas sin carga, ya que parecían mostrar menos señales inespecíficas. En ambos casos, las sondas utilizadas fueron marcadas con Digoxigenina mediante PCR.

Marcaje de sondas con digoxigenina mediante PCR

Para el marcaje de las sondas empleadas en los ensayos de Southern blot se utilizó un marcaje no radiactivo, incorporando moléculas de digoxigenina-dUTP *DIG-11-dUTP* (Roche) a las sondas mediante reacciones de PCR.

En el caso de las membranas sin carga la reacción de marcaje por PCR se llevó a cabo en un volumen de 100 µl con 5 nM de digoxigenina-dUTP, 150 nM de dATP/dCTP/dGTP, 47,5 nM de dTTP y 15% de glicerol. Para las membranas cargadas positivamente las reacciones de marcaje se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl con 60 nM de digoxigenina-dUTP, 0,2 mM de dATP/dCTP/dGTP y 0,13 mM de dTTP.

En ambos casos, la cuantificación de la sonda marcada se realizó por electroforesis en geles de agarosa mediante la comparación con un marcador de peso molecular.

Southern Blot: Membranas de nylon sin carga

Transferencia del ADN a la membrana: El gel se puso en solución de desnaturalización durante 30 minutos en agitación y se lavó con agua ultra pura (UP) para eliminar bien la solución. A continuación se añadió la solución de neutralización y se puso en agitación durante 30 minutos, al cabo de los cuales también se lavó con agua UP.

Solución de desnaturalización		Solución de neutralización	
NaOH	0,4 N	Tris·HCl pH=7,5	0,5 M
NaCl	0,6 M	NaCl	1,5 M
➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C		➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C	

El sistema de transferencia se montó sobre una bandeja con solución de transferencia. Se colocó sobre ella un cristal que funcionó como soporte para el resto de componentes. En primer lugar se colocó un puente de papel Whatman, sobre él se colocó el gel invertido, a continuación la membrana *Biodyne Membrane* (Pall corporation), y sobre ella cuatro capas de papel Whatman. Todos estos componentes fueron empapados previamente en solución de transferencia. Por último se colocó una pila de papeles de filtro o servilletas, con un pequeño peso en la parte superior. La transferencia se llevó a cabo durante toda una noche.

Solución de transferencia	
NaPO₄ pH=6,5	25 mM
▪ Na₂HPO₄ (stock 1M)	500 ml
▪ NaH₂PO₄ (stock 1M)	600 ml
➤ Ajustar el pH=6,5 (NaH ₂ PO ₄)	
➤ Autoclavar 20 minutos a 121°C	

Finalizada la transferencia se lavó la membrana durante 15 minutos con tampón 2XSSC, y a continuación se sometió a un pulso de luz ultravioleta en *XL-100 UV Crosslinker* (Spectrolinker). Se horneó la membrana durante 90 minutos a 90°C, quedando tras esto preparada para ser hibridada, pudiendo incluso guardarse para un uso posterior.

Hibridación de la membrana: Tanto la prehibridación como la hibridación se llevaron a cabo en botellas de cristal en un horno de hibridación. La prehibridación se realizó a 65°C durante al menos 4 horas con un volumen de 12 ml de solución de prehibridación. Pasado el período se eliminó esta solución y se añadió la solución de hibridación con 100 ng de sonda previamente desnaturalizada por cada mililitro de solución, utilizando normalmente 10 ml de solución de hibridación, (1 µg de sonda en total). La hibridación se llevó a cabo durante 14-16 horas también a 65°C.

Solución de prehibridación/hibridación	
SSC (stock 20X)	5X
LSS	0,01 %
SDS	0,02 %
Blocking reagent (Roche)	0,3 %
➤ Calentar a 65°C para su disolución	
➤ Usar a temperatura ambiente	

Solución 20X SSC	
NaCl	3 M
Citrato de sodio	0,3 M
➤ Ajustar el pH=7 (NaOH)	

Lavados: Tras el período de hibridación, las membranas fueron extraídas de las botellas y sometidas a los sucesivos lavados. Todos los lavados se hicieron en agitación y a temperatura ambiente, excepto dos lavados en tampón HSW a 65°C.

En primer lugar se realizaron dos lavados en tampón HSW durante 5 minutos, seguidos de dos lavados de 15 minutos cada uno en el mismo tampón a 65°C. A continuación la membrana se pasó a tampón B1 durante un minuto y posteriormente se lavó durante 30 minutos con tampón B2, que es un tampón de bloqueo. El siguiente lavado se realizó con el anticuerpo *anti-digoxigenin-AP*, *Fab fragments* (Roche), 6,6 µl de anticuerpo en 100 ml de solución B2. A continuación se realizaron dos lavados de 15

minutos en tampón B1, y un último lavado de 5 minutos en tampón B3. Tras estos lavados se realizó la incubación con el sustrato *CDP-Star* (Roche) durante un minuto, preparado con 50 ml de B3 y 100 µl del sustrato. El sustrato se puede reutilizar siendo necesario filtrarlo antes de su uso.

Tampón HSW	
SSC	0,15 X
SDS	0,1 %

Solución B2	
Tris·HCl pH=7,5	0,01 M
NaCl	0,15 M
Blocking reagent	0,2 %

Solución B1	
Tris·HCl pH=7,5	0,01 M
NaCl	0,15 M

Solución B3	
Tris·HCl pH=9,5	0,1 M
NaCl	0,1 M

Tras esto se embolsó la membrana y se pasó a exponer con películas sensibles a quimioluminiscencia *Hyperfilm* (Amersham) durante 2-3 horas. Tras este tiempo se revelaron las películas usando revelador y fijador AGFA *G-150* y *G-354*, respectivamente.

Reutilización de las membranas: Algunas membranas se reutilizaron e hibridaron con otra sonda. Para ello se conservaron en 2X SSC a 4°C, y antes de su nuevo uso se lavaron en tampón HSW hirviendo durante 5 minutos.

Southern Blot: Membranas de nylon con carga positiva

Transferencia del ADN a la membrana: En este caso se partió de la misma cantidad de ADN y la electroforesis se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el caso de las membranas sin carga. Tras finalizar la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio durante una hora y posteriormente se dejó durante 2'30" en un transiluminador con luz ultravioleta. Se incubó el gel con solución de desnaturalización II durante 30 minutos en agitación suave. Se lavó con agua UP y se puso el gen con solución de neutralización/transferencia durante 15-20 minutos. A continuación se montó el sistema de transferencia de igual forma al caso anterior, usando las membranas de nylon con carga *Nylon membrane, positively charged* (Roche). Se dejó igualmente transfiriendo durante toda una noche. Una vez que finalizó la transferencia, se lavó la membrana con tampón 2XSSC y se sometió a un pulso de luz ultravioleta en el espectrolinker. Tras ello

la membrana quedó preparada para la hibridación, pudiendo guardarse en este paso o ser usada.

Solución de desnaturalización II		Solución de neutralización/transferencia	
NaOH	0,5 M	Acetato amónico	1 M
NaCl	1,5 M		

Hibridación de la membrana: La prehibridación de las membranas se llevó a cabo durante al menos 6 horas a 65°C, y se utilizaron 12 ml de solución por botella. A continuación se dejó hibridando durante 14 horas también a 65°C y con 10 ml de solución de hibridación a la que se añadió un total de 100 ng de sonda.

Solución de prehibridación/hibridación	
Na ₂ HPO ₄ pH=7,2	0,25 M
SDS	7 % (p/v)
➤ Calentar la solución a 65°C y añadir:	
Esperma de salmón (desnat.)	100 µg/ml

Lavados: Todos los lavados de la membrana se llevaron a cabo en agitación y temperatura ambiente, excepto dos lavados a 65°C con el tampón HSW.

En primer lugar se realizaron dos lavados de 5 minutos con HSW, seguidos por dos lavados de 15 minutos en el mismo tampón a 65°C. Se lavó durante 1 minuto en tampón maleico y se bloqueó durante 30 minutos con una solución de bloqueo. A continuación se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo anti-digoxigenina en una dilución 1:20000 en tampón de bloqueo. Posteriormente se sometió la membrana a tres lavados de 10 minutos en tampón de lavado (WB), y un lavado de 5 minutos con tampón B3. Tras todos los lavados se incubó la membrana con el sustrato quimioluminiscente *CDP-Star* durante 5 minutos, en una dilución 1:200 en tampón B3.

Tampón B3		Tampón maleico	
ClNa	40 mM	Maleico	0,1 M
Tris pH=9	0,1 M	ClNa	0,15 M
		NaOH	0,175 M
		➤ Ajustar pH=7,5 (NaOH 10M; 1M)	
Solución de lavado (WB)		Solución de bloqueo	
Tween 20 (en maleico)	0,3 % (v/v)	Blocking reagent (en maleico)	1 % (p/v)

Las membranas se embolsaron y se pusieron a exponer igual que en el caso anterior durante 2-3 horas.

Reutilización de las membranas: En algunos casos las membranas se rehibridaron con otras sondas. Para ello se lavó la membrana con tampón 2X SSC, y a continuación se pasó por SDS 0,1 % (p/v) hirviendo durante 10 minutos en agitación. Por último 5 minutos con tampón WB o 2X SSC.

I.8. HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (*FISH*)

Obtención de Preparaciones Cromosómicas

Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron a partir de raicillas de unos dos centímetros de longitud que fueron sometidas a un pretratamiento en frío para la acumulación de metafases: las raíces se introdujeron en tubos con agua UP y se dejaron en un baño con hielo picado durante 24-30 horas, dependiendo del material. Pasado este tiempo las raíces se pasaron a nuevos tubos con solución Carnoy para su fijación. En esta solución el material se puede conservar a 4°C durante algunos días hasta su utilización, o puede ser almacenado durante meses a -20°C. Cuando se necesitó obtener una planta desarrollada, se dejó al menos la raicilla central para asegurar el posterior desarrollo de la planta.

Solución Carnoy	
Etanol absoluto	75% (v/v)
Ácido acético glacial	25% (v/v)

Para la obtención de preparaciones cromosómicas libres de citoplasma y demás residuos celulares se siguió el método descrito por Schwarzscher y col., (1993) con algunas modificaciones. Salvo otra especificación, todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente en pequeños viales o placas Petri. El material debe de ser cuidadosamente manipulado con pinzas o, si es demasiado pequeño, con pipetas.

Una vez fijadas las raíces, se lavaron con un tampón de lavado durante 5 minutos en agitación y se dejaron en reposo en este tampón durante 30 minutos. A continuación se incubaron con una solución enzimática a 37°C durante 30-60 minutos, en función de la

dureza del material y del tiempo de fijación. Posteriormente se lavaron de nuevo las raíces con tampón de lavado durante 15 minutos.

La disección de cada raíz se llevó a cabo sobre portaobjetos desengrasados con etanol absoluto sobre los que se colocó una gota de ácido acético al 45% separando las células meristemáticas del resto de la raíz, que se retiró de la preparación. A continuación se procedió a aplastar el material colocando sobre éste un cubreobjetos y presionando firmemente con el dedo. Se comprobó la presencia de buenas metafases con ayuda de un microscopio, y las preparaciones elegidas se congelaron con anhídrido carbónico. Se retiró el cubreobjetos con un bisturí y las preparaciones se secaron al aire.

En el caso de que las preparaciones no vayan a ser utilizadas en las siguientes 24 horas a su obtención, éstas pueden ser almacenadas una vez secas a 4°C durante algunas semanas, o a -20°C en el caso de tiempos más prolongados, sin afectar a los resultados de los experimentos de hibridación *in situ*.

Tampón de lavado		Solución enzimática	
Ácido cítrico	0,01 M	Celulasa <i>Aspergillus niger</i>	2% (p/v)
Citrato trisódico pH=4,6	0,01 M	Pectinasa <i>Aspergillus niger</i>	20% (p/v)

Hibridación

La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Heslop-Harrison y col. (1991) con ligeras modificaciones.

Las preparaciones se secaron a temperatura ambiente y se sometieron a una serie de pretratamientos necesarios previos a la hibridación.

Tratamiento con ARNasa: Las preparaciones se incubaron durante 1 hora a 37°C con una solución de ARNasa (Roche) libre de ADNasa de 100 µg/ml en solución 2X SSC. Tras la incubación se lavaron en 2X SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Fijación con paraformaldehído: Se fijó durante 10 minutos con una solución de 4% paraformaldehído con unas gotas de NaOH 10N. A continuación se lavó de nuevo durante 10 minutos con 2X SSC.

Deshidratación: Las preparaciones se deshidrataron pasándolas por una serie de alcohol etanol al 70%, 90% y 100% durante 3-5 minutos en cada uno, y se dejó secando al aire durante al menos 1 hora.

Desnaturalización: Antes de proceder a la hibridación es necesario que tanto la sonda como los cromosomas estén previamente desnaturalizados. Este paso se realizó conjuntamente para ambos, sometiendo las preparaciones con la mezcla de hibridación a temperaturas de desnaturalización. No obstante para asegurar este paso, se sometió la mezcla de hibridación con la sonda a un paso previo de desnaturalización 70°C durante 5 minutos. Para la desnaturalización conjunta de cromosomas y sondas se utilizó un termociclador *PTC-100 Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc.) en el que se programó un ciclo de 5 minutos a 75°C, 2 minutos a 55°C, 30 segundos a 50°C, 1 minuto a 45°C, 2 minutos a 42°C, 5 minutos a 40°C y 5 minutos a 38°C.

Hibridación: La hibridación se llevó a cabo incubando las preparaciones en una cámara húmeda a 37°C durante al menos 16 horas con la mezcla de hibridación en 2XSSC. Se añadió entre 30-80 ng de sonda marcada en un volumen de mezcla de 30 µl por preparación.

Mezcla de Hibridación		Tampón TNT	
Formamida desionizada	50% (v/v)	Tris·HCl pH=7,5	0,1 M
Dextrano de sulfato	10% (v/v)	NaCl	0,15 M
SDS	0,1% (p/v)	Tween	0,05 %
ADN de salmón (desnaturalizado y fragmentado)	0,16 µg/µl		

Lavados: Se utilizaron condiciones que permitieron detectar hibridación en casos de más de un 85% de homología. Los lavados se llevaron a cabo a 42°C salvo otra especificación. Se realizó un primer lavado de 5 minutos en 2X SSC seguido de un lavado durante 10 minutos en formamida 20% en 0,1X SSC, 5 minutos en 0,1X SSC, 5 minutos en 2X SSC y 5 minutos en el 4X SSC Tween 0,2%. El último lavado se realizó a temperatura ambiente durante 5 minutos en tampón TNT.

Amplificación de la señal de hibridación

Se empleó el sistema de amplificación *Renaissance TSA Biotin system* (Perkin Elmer). Los productos usados son los proporcionados por la casa comercial, y los tampones son preparados según sus indicaciones.

Bloqueo: Se lleva a cabo a temperatura ambiente en una caja húmeda durante 30 minutos con solución bloqueante TNB. A continuación se elimina el exceso sin llegar a lavar.

Anticuerpo: Se incuban las preparaciones con streptavidina-peroxidasa (SA-HRP) 1:50 en TNB, durante 75 minutos a temperatura ambiente y en agitación en la caja húmeda. A continuación se realizan tres lavados de 5 minutos en TNT a temperatura ambiente y agitación.

Sustrato: Se añaden 50 µl del sustrato tiramida biotinada en TNT durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se hacen tres lavados de 5 minutos en TNT a temperatura ambiente y agitación.

Detección: la detección de la biotina se realiza con streptavidina-Cy3 (Sigma) en una dilución 1:300 en TNT. Se incuba durante 1 hora a 37°C, lavándose posteriormente en TNT 5 minutos, tres veces.

Contratinción

La contratinción se realiza con DAPI durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. El montaje se realiza con el medio de montaje para fluorescencia *Vectashield* (Vector Laboratories).

Rehibridación de las preparaciones con pTa794

Para la identificación de los cromosomas las preparaciones fueron rehibridadas con la sonda pTa794 para detectar el ADN ribosomal 5S presente en el brazo corto de los cromosomas del GH 1 y 5. Para ello las preparaciones fueron lavadas en 4X SSC/Tween 0,2% a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos, a continuación se lavaron durante 5 minutos con 2X SSC para quitar el jabón, y se deshidrataron en etanol como ya se ha descrito. Se dejaron secar procediéndose a continuación a la hibridación con la nueva sonda, que en este caso fue marcada con digoxigenina

La hibridación se realizó siguiendo los pasos descritos anteriormente, al igual que los posteriores lavados, con excepción del último lavado con TNT que fue sustituido por un lavado en 4X SSC a durante 5 minutos a temperatura ambiente. En este caso no es necesario llevar a cabo el paso de amplificación de la señal, con lo que se añadió directamente el anticuerpo anti-dig-Fitc (fluoresceína) en una dilución 1:50 durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. A continuación se lavó con 4X SSC durante 30 minutos a temperatura ambiente. El bloqueante en este caso fue BSA 5%/4X SSC, que se dejó durante 5 minutos. A partir de aquí, la contra tinción y montaje es igual que en el caso anterior.

I.9. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

Cultivo y transformación de *S. cerevisiae*

Preparación de cultivos: Se partió bien del stock en glicerol o de colonias aisladas, y se inoculó el medio SD-*dropout* apropiado (composición más adelante), dejando crecer durante 16-18 horas a 30°C y 230 rpm. Pasado este tiempo se obtuvo un cultivo en fase estacionaria ($O.D._{600nm} > 1,5$). Para la obtención de un cultivo en fase exponencial de crecimiento se transfirió un inóculo de un cultivo saturado a medio fresco hasta alcanzar una $O.D._{600nm}$ entre 0,2 y 0,3 (aproximadamente 1/10 de volumen de preinóculo). Se incubó a 30°C durante 3-5 horas en agitación de 230 rpm, hasta alcanzar el cultivo una $O.D._{600nm}$ de 0,4-0,6.

Mantenimiento de las cepas a largo y medio plazo: Las cepas de levadura pueden ser almacenadas indefinidamente a -80°C en medio SD con 25% de glicerol. Las células transformadas deben ser almacenadas en un medio apropiado SD-*dropout* para el mantenimiento de los plásmidos. Para la preparación de los stocks se partió de un cultivo saturado de la cepa EGY48[p8op-lacZ] en medio SD/Ura⁻ (composición más adelante) y se añadió glicerol a una concentración final de 25%. Se guardó a -80°C para su posterior uso. En algunos casos se trabajó con colonias de levaduras en placas con medio SD agar. Para obtenerlas se incubaron las placas a 30°C durante 3-5 días, hasta que las colonias alcanzaron un diámetro aproximado de 2 mm. Las placas se sellaron con parafilm y se guardaron a 4°C hasta dos meses.

Preparación de células competentes: Se utilizó como preinóculo un cultivo saturado de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EGY48[p8op-lacZ] en medio SD Ura⁻, y se añadió a medio fresco hasta alcanzar una O.D._{600nm}=0,2-0,3 (aproximadamente se usó 1/10 de volumen como preinóculo). Se incubó durante 3 horas, hasta alcanzar una O.D._{600nm} del doble de la de partida, entre 0,4-0,6. A continuación se centrifugó el cultivo 5 minutos a 2200 rpm y temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con agua destilada. Se centrifugó en iguales condiciones y se disolvieron las células en tampón TE/LiAc. Se utilizaron 500 µl de tampón TE/LiAc por cada 100 ml de cultivo de partida. Las células competentes deben dejarse reposar 5 minutos en hielo antes de comenzar la transformación, y deben usarse en el día.

Tampón TE/LiAc	
TE (10X)	1X
LiAc (10X)	1X

Solución PEG/LiAc	
PEG 4000 (stock 50%)	40% (p/v)
TE (stock 10X)	1X
LiAc (stock 10X)	1X

Tampón LiAc 10X	
Acetato de litio	1 M
➤ Ajustar pH=7,5 (ác. acético diluido)	
➤ Autoclavar 20 min a 121°C	

Tampón TE 10X	
Tris·HCl	0,1 M
EDTA	10 mM
➤ Ajustar pH= 7,5	
➤ Autoclavar 20 min a 121°C	

Transformación de *S. cerevisiae*: Se realizó una transformación de las levaduras mediada por acetato de litio. El proceso de transformación de la cepa se llevó a cabo como paso previo para realizar los ensayos de doble híbrido en levaduras. Para la transformación se utilizó 0,1 µg de cada plásmido junto con 0,1 mg de *Herring sperm DNA solution* (Invitrogen). Se añadieron 100 µl de células de levaduras competentes y 600 µl de solución PEG/LiAc, y se incubó en un bloque seco durante 30 minutos a 30°C y 600 rpm. Pasado este tiempo se añadieron 70 µl de DMSO y se sometió a un choque térmico de 42°C durante 15 minutos. Posteriormente se enfriaron en hielo y centrifugaron a 13000 rpm durante 30 segundos. El precipitado de células se disolvió en 500 µl de TE 1X.

Las células transformadas se sembraron en placas con medio SD agar y el agente selector correspondiente en cada caso (más adelante se detallan los medios empleados). Se sembraron 100 µl en el caso de las transformaciones simples y 250 µl en el caso de haber co-transformado con dos plásmidos. Las placas se incubaron durante 3-4 días a

30°C. Una vez crecidas las colonias las placas se pueden sellar y guardar a 4°C durante 3-4 semanas.

Ensayos de Doble Híbrido en Levaduras

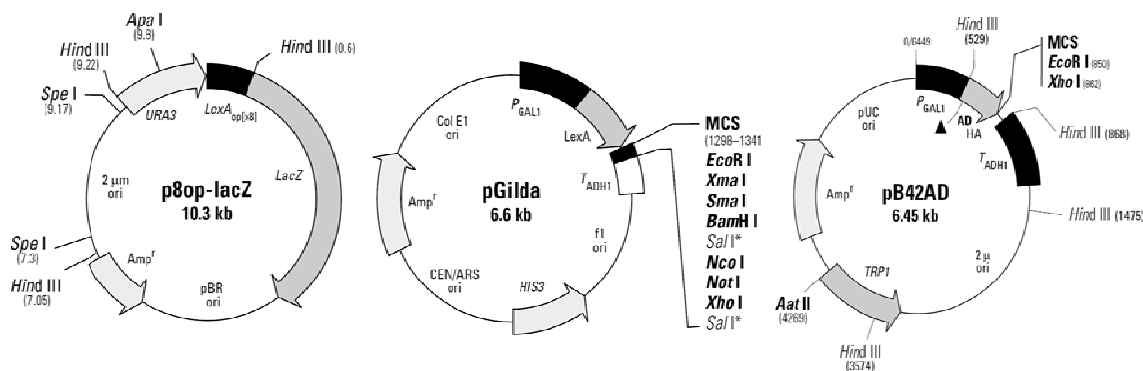
Para los ensayos de interacción de proteínas mediante la técnica del doble híbrido se utilizó el kit *Matchmaker LexA Two-Hybrid system* (Clontech). Este sistema emplea dos genes delatores, *LEU2* y *lacZ*, bajo el control de múltiples operadores tipo LexA. El gen *LEU2* permite a la cepa EGY48 auxótrofa *Leu⁻* crecer en un medio de inducción SD carente de leucina. El gen *lacZ* codifica para la enzima β -galactosidasa, cuya actividad puede ser monitorizada mediante diferentes ensayos. El gen *LEU2* es precedido por seis copias del operador LexA, y el gen *lacZ* por ocho copias. Cada operador LexA puede unir dos proteínas LexA.

El principio de los ensayos de doble híbrido se basa en la naturaleza modular de los factores transcripcionales, normalmente compuestos por dominios físicamente separables y funcionalmente independientes. Estos son un dominio de unión a ADN (ADN-BD) y un dominio de activación de la transcripción (AD), que se encuentran cada uno en un vector de clonación, donde se clonarán los ADN copia codificantes para las proteínas en las que se quiere estudiar la interacción. Así, se expresarán en forma de proteínas híbridas o proteínas de fusión. En caso de que se produzca interacción entre las proteínas problema, esto va a suponer una proximidad entre los dominios ADN-BD y AD. A su vez el dominio ADN-BD, que en este caso es una parte de la proteína LexA, va a reconocer y unirse específicamente a las zonas de los operadores LexA, de modo que la proximidad del dominio AD va a activar los genes que se encuentran bajo el control de estos operadores, que son los genes delatores *LEU2* y *lacZ*. Por tanto la expresión de estos genes delatores es indicativa de interacción entre las proteínas problema.

Componentes del Sistema

- ***Saccharomyces cerevisiae* EGY48 [p8op-lacZ]** cepa hospedadora transformada con el plásmido delator p8op-lacZ; en su genoma porta el gen delator *LEU2* bajo el control de seis operadores LexA. Esta cepa es auxótrofa *Leu⁻*, *Ura⁻*, *Trp⁻* e *His⁻*

- **p8op-lacZ** plásmido delator portador del gen delator *lacZ* bajo el control de ocho operadores LexA y con el promotor mínimo *GALI* (no regulable por glucosa ni galactosa). Este plásmido se encuentra en un elevado número de copias lo que permite, junto con los múltiples operadores, una amplificación de la señal en casos de interacciones débiles. Además lleva el gen *URA3* para su selección en levaduras, así como el marcador *Amp^r* para su selección en *E. coli*.
- **pGilda** vector de clonación usado para expresar proteínas de fusión de una de las proteínas problema con parte de la proteína LexA, que actúa como dominio de unión a ADN. La expresión de la proteína híbrida está regulada por un promotor *GALI*. pGilda porta el gen *HIS3* para la selección en levaduras, se replica autónomamente tanto en *S. cerevisiae* como en *E. coli*, y para su selección en *E. coli* lleva el marcador *Amp^r*.
- **pB42AD** vector de clonación que contiene un activador de la transcripción, en concreto 88 residuos del activador B42 de *E. coli*. Expresa proteínas de fusión de la proteína problema junto con el activador. Esta proteína de fusión se expresa bajo el control del promotor inducible *GALI*. Se puede propagar y seleccionar tanto en *E. coli* como *S. cerevisiae*, con el marcador de transformación *TRP1* para su selección en levaduras, y *Amp^r* para su selección en *E. coli*.



Medios de selección para el control de transformaciones

Cada plásmido empleado en el sistema LexA porta un marcador nutricional para la selección de levaduras transformadas. Debido a que los plásmidos empleados tienen diferentes marcadores nutricionales pueden ser seleccionados independientemente.

El medio de selección empleado dependerá de: los plásmidos usados, si se selecciona para uno, dos o tres plásmidos; si se seleccionan colonias con interacción de proteínas híbridas; y si se desea que las proteínas de fusión sean o no expresadas.

Ya que la expresión de las proteínas de fusión está bajo el control del promotor inducible *GALI*, la presencia de glucosa en el medio está reprimiendo la expresión de estas proteínas híbridas. Para estimular su expresión el medio debe llevar galactosa, y también se le añade rafinosa para ayudar en el crecimiento. Ya que el promotor *GALI* es muy sensible a la represión por glucosa, la galactosa y rafinosa deben ser muy puras, con un contenido en glucosa inferior al 0,01%.

Medio SD	
YNB (yeast nitrogen base)	1,7 g/l
(NH₄)₂SO₄	5 g/l
Glucosa	20 g/l
➤ Ajustar pH=5,8 (NaOH 1M)	
➤ Autoclavar 20 min a 115°C	
➤ Para medios sólidos añadir:	
Micro agar	1,7% (p/v)

Medio SD Gal+/Raf+	
YNB (yeast nitrogen base)	1,7 g/l
(NH₄)₂SO₄	5 g/l
Galactosa	20 g/l
Rafinosa·5H₂O	11,5 g/l
➤ Ajustar pH=5,8 (NaOH 1M)	
➤ Autoclavar 20 min a 115°C	
➤ Para medios sólidos añadir:	
Micro agar	1,7%

Drop Out Supplement (Clontech)	
Ura⁻	0,77 g/l
His⁻/Ura⁻	0,75 g/l
Trp⁻/Ura⁻	0,72 g/l
His⁻/Trp⁻/Ura⁻	0,70 g/l
His⁻/Leu⁻/Ura⁻	0,65 g/l
Leu⁻/Trp⁻/Ura⁻	0,62 g/l
His⁻/Leu⁻/Trp⁻/Ura⁻	0,60 g/l

Plásmido	Gen nutricional	Medio
p8op-lacZ	<i>URA3</i>	Ura ⁻
pGilda	<i>HIS3</i>	His ⁻
pB42AD	<i>TRP1</i>	Trp ⁻

Detección de interacciones: genes delatores

Se realizaron dos ensayos distintos para la detección de interacciones entre las proteínas híbridas. El ensayo de la β -galactosidasa en filtro, que detecta la expresión del gen delator *lacZ*, y el ensayo de crecimiento, que detecta la expresión del gen delator *LEU2*. Además se llevaron a cabo ensayos de toxicidad, para comprobar que las proteínas híbridas expresadas no resultaban tóxicas para las células; y controles de autoactivación para descartar que la activación de los genes delatores viniera dada por la expresión de una única proteína híbrida, y no por la interacción de ambas, o por acción de alguna proteína endógena de levaduras.

Ensayo de β -galactosidasa en filtro: Estos ensayos se llevaron a cabo en medios SD/Gal⁺/Raf⁺/His⁻/Leu⁻/Trp⁻/Ura⁻, donde la presencia de estos azúcares induce la expresión de las proteínas de fusión, y además al ser medios Leu⁻ se está seleccionando a la vez para la expresión del gen delator *LEU2*. El ensayo se realizó a partir de nueve colonias seleccionadas al azar de las placas SD (con glucosa). En este ensayo se incluyeron todas las interacciones a probar, así como los controles positivo y negativo, realizándose igualmente controles de autoactivación.

Tampón Z		Tampón Z/X-Gal	
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	60 mM	Tampón Z	100 ml
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	31,6 mM	1-tioglicerol	270 µl
KCl	10 mM	X-Gal (20 mg/ml en DMSO)	1,67 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM	➤ Preparar en el momento de su uso	
➤ El pH debe ser 7			
➤ Autoclavar 20 min a 121°C			
➤ Almacenar a temperatura ambiente			

En cada placa con el medio citado anteriormente se colocó un papel de filtro redondo de 70 mm de diámetro estéril, de forma que al colocarlo sobre el medio quedó totalmente en contacto con éste, y ligeramente empapado. Sobre estos filtros se pipetearon las nueve colonias seleccionadas. Para ello se disolvió parte de la colonia en 3 µl de agua UP estéril, y se depositó sobre el papel de filtro. Estas placas fueron incubadas durante 3-4 días a 30°C, y pasado este tiempo se procedió al revelado del ensayo. Para ello se prepararon bandejas con tres capas de papel de filtro empapados en tampón-Z/X-Gal. Se retiraron los filtros redondos con las colonias de las placas y de uno en uno se sumergieron durante 20 segundos en nitrógeno líquido. Una vez descongelados los filtros redondos se fueron colocando con la cara de las levaduras hacia arriba sobre los filtros de las bandejas, de forma que la solución con X-Gal fue empapando todo los filtros con las colonias. Una vez colocados todos los filtros con las levaduras en las bandejas con el tampón se incubaron a 30°C hasta un total de 8 horas, realizando observaciones en el viraje de color de las colonias cada hora.

Ensayos de crecimiento: Para los ensayos de crecimiento se empleó el mismo medio que en los ensayos anteriores, SD/Gal⁺/Raf⁺/His⁻/Leu⁻/Trp⁻/Ura⁻. Mediante este ensayo se detectó la actividad del gen delator *LEU2*, para lo que se partió de 2 ó 3 colonias de levaduras del medio SD (glucosa) que fueron incubadas a 30°C durante 10 días, observando el crecimiento a los 4 y 10 días desde la inoculación.

Ensayos de toxicidad: Para los ensayos de toxicidad se cogieron como inóculos 2 ó 3 colonias de los medios SD (glucosa) incubándose durante 10 días a 30°C comparándose el crecimiento observado en estas placas con el de los ensayos de crecimientos. Estos ensayos se hacen en medio SD/Gal⁺/Raf⁺ y Leu⁺, carente de los aminoácidos correspondientes para cada plásmido probado.

Controles de autoactivación: Para llevar a cabo estos controles se transformaron levaduras con un solo plásmido híbrido y se chequearon de esta forma todos los plásmidos usados en los diferentes ensayos de interacción. El procedimiento fue el mismo que el seguido para las transformaciones dobles, variando simplemente la composición de los medios en cuanto a los suplementos *Drop Out* de aminoácidos, adecuándola a los plásmidos que portaban las levaduras en cada caso. Una vez transformadas las levaduras se sembraron en placas con medio SD/His⁻/Ura⁻ o SD/Trp⁻/Ura⁻, según porten el plásmido pGilda o pB42AD, respectivamente. Tras dejar crecer durante 3-4 días a 30°C, se tomaron parte de estas colonias como inóculo y se realizaron los ya descritos ensayos de crecimiento, de la β -galactosidasa en filtro, y de toxicidad. En este caso se esperó un resultado negativo para los dos primeros ensayos, ya que la activación de los genes delatores debería ser resultado sólo de una interacción entre las proteínas híbridas.

Anexo II – OLIGONUCLEÓTIDOS

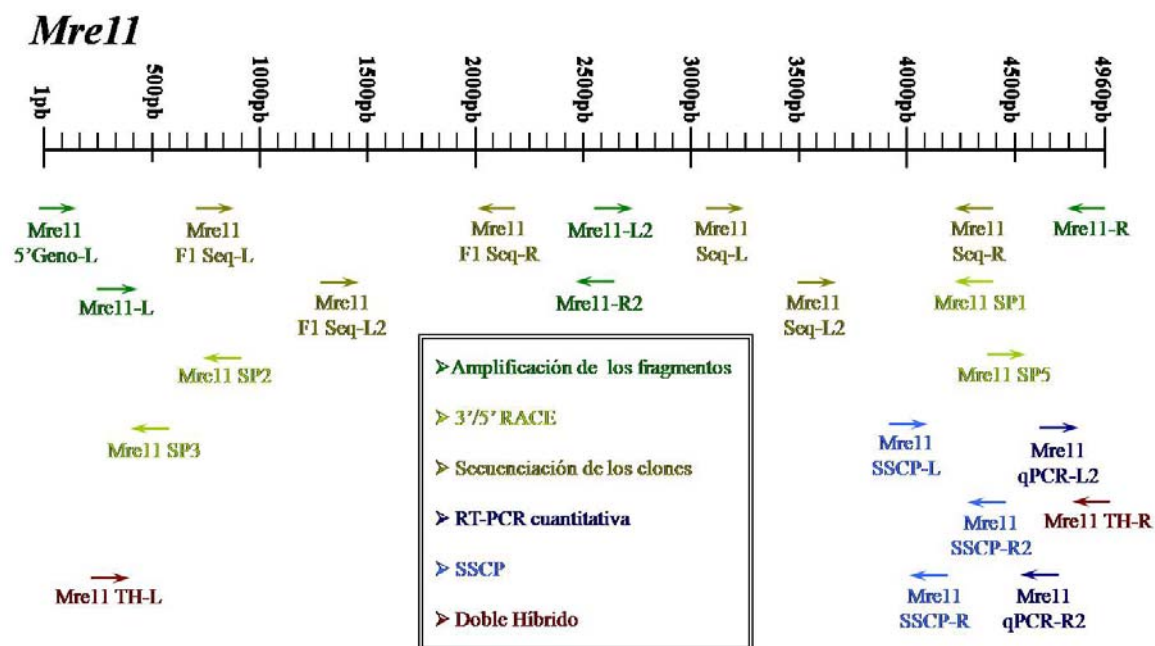
ANEXO II. OLIGONUCLEÓTIDOS

II.1. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS SOBRE *Mre11*

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilidad
Mre11-L	TGC CAT CTG GGC TAC ATG GA	Amplificación de las secuencias genómicas y de ADN copia
Mre11-R	GAG AAT CAT CTC CTC TTG AC	
Mre11-L2	CGG TTT GGT CAG AAG TAT G	
Mre11-R2	AAC AAG AGG CCA TGA AAT GAG	
Mre11 5'geno-L	GTT AGA ACC AGC AGA GGC AAT G	
Mre11 F1Seq-L	CAT GAG AAA GCC TGT TAC	Secuenciación de clones
Mre11 F1Seq-R	CCA AAT GTT CAA GAA CAG A	
Mre11 F1Seq -L2	CAT TAG AGA TGA GCG ACT G	
Mre11 Seq-L	ATG CTC ACT GTT AGT TTA G	
Mre11 Seq-R	TGC GAA TAG CAG CAC TTG	
Mre11 Seq-L2	TGA TTT GCT ACC GTT CTG	
Mre11 SP1	TGC GAA TAG CAG CAC TTG	5'/3' RACE
Mre11 SP2	CCA TGG ATA GTG AAC ACA GG	
Mre11 SP3	CAC TGA CAA CCT GGA ACT TCA C	
Mre11 SP5	ATT CGC AGT GAG GAG GTG GAC	
Mre11 F1Seq -L2	CAT TAG AGA TGA GCG ACT G	Sondas para Southern Blot
Mre11 Seq-R	TGC GAA TAG CAG CAC TTG	
Mre11 SSCP-L	AGA GGT AAA TCT GTA GCA GC	SSCP
Mre11 SSCP-R	GGG TGG TTT GTT TCA ATG AG	
Mre11 SSCP-R2	GGA TCT GAA TTT TCA ACA ACT TC	
Mre11 qPCR-L2	CCC ACA AAG TGG ACG GAA GA	RT-PCR cuantitativa
Mre11 qPCR-R2	GCT TGG CAT GGA ACC AGT GT	
Mre11 TH-L	CGC GGA TCC CAG CAG AGG CAA TGG A	Doble híbrido
Mre11 TH-R	ATA GTT TAG CGG CCG C CAG AAT CAT CTC CTC TTG AC	

- **GGA TCC** : Diana para la enzima *Bam*HI
- **G CGG CCG C**: Diana para la enzima *Not*I

Anexo II - Oligonucleótidos

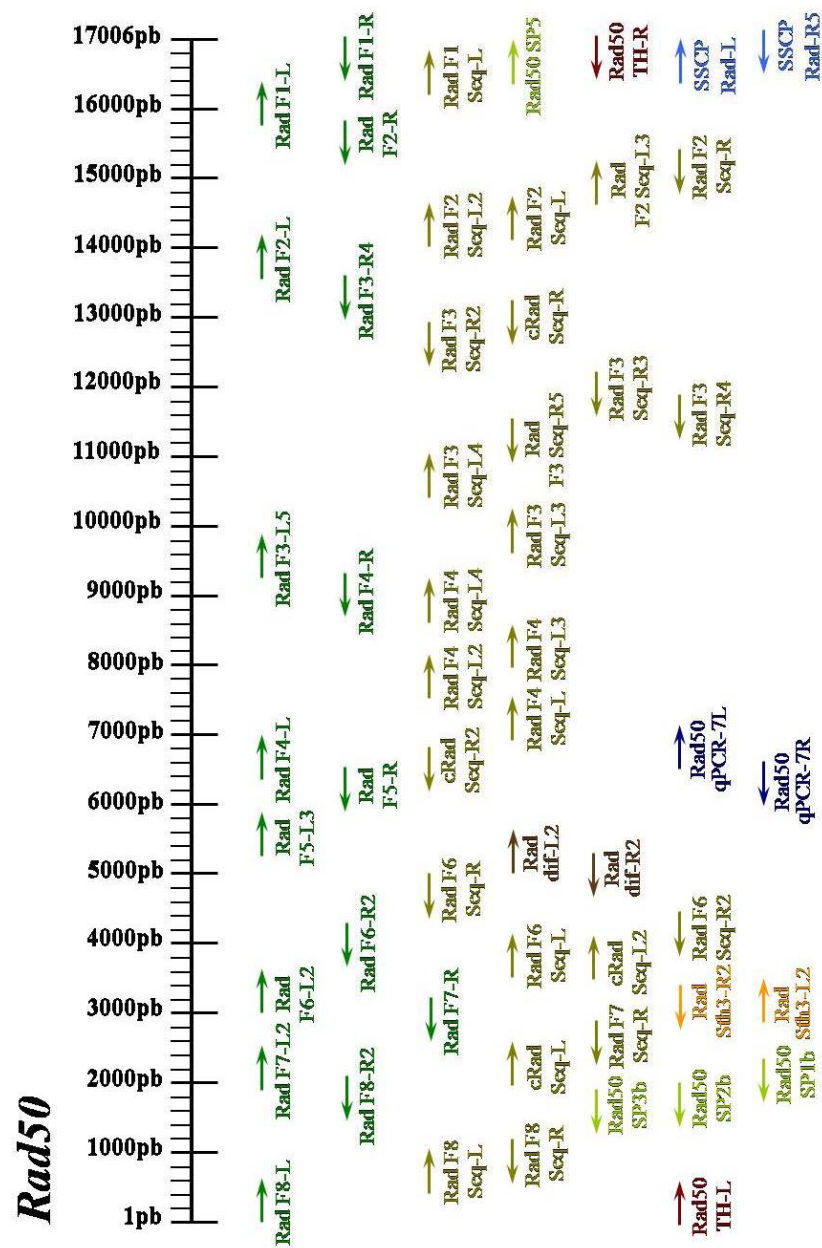


II.2. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS SOBRE *Rad50*

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilidad
Rad F1-L	AAT TGT GGC AGC AGA CAT ACA GA	Amplificación de las secuencias genómicas y de ADN copia
Rad F1-R	TAG TCA AAT ATC TCT TGG GCT TCT	
Rad F2-L	CAG CAT GTC TAC TAT AGA AGC TG	
Rad F2-R	TTG GCC TCT GTA TGT CTG CTG	
Rad F3-L5	TAG ACG ATC TCA GGG ATC AG	
Rad F3-R4	AGC ATG CCG CTT AAG ATC AG	
Rad F4-L	TGT GAT CGT GCT TTC ACA CCT G	
Rad F4-R	GCA TCT GAG CAT TTG ATA GAT CC	
Rad F5-L3	CGC AGG TCT GTA GAC TCA G	
Rad F5-R	GGT CCT CTT CAT CAG GTG TG	
Rad F6-L2	AGT ATG CTG CTC TTT CTG	
Rad F6-R2	TAA GTA AGC GTG CAG TGA	
Rad F7-L2	AGT CTG CCT CAG CTA CAG A	
Rad F7-R	TCC TTC AGC TCC TCA TCA G	
Rad F8-L	GTG GAC AAG ATG CTG ATC	
Rad F8-R2	TAA GGT AGT GAA GTT TTG AC	
Rad F1 Seq-L	GCA GAG ACA TTC TGT CTG	Secuenciación de clones
Rad F2 Seq-L	CCT GCA GTA TAA TAG GTG TC	
Rad F2 Seq-R	GGT TCG TTG ACA GTT TGA C	
Rad F2 Seq-L2	ATA TGG CTG ACA CCT TG	
1Rad F2 Seq-L3	CCA TTA TTC TTA CCA TGT C	

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilidad
Rad F3 Seq-R2	AGC TGT AAG CCC ATG ACA G	Secuenciación de clones
Rad F3 Seq-L3	CAA GCT TGT AGA CAT GCC AC	
Rad F3 Seq-R3	CAA CTT GCA CGT GAT TGA C	
Rad F3 Seq-L4	GCA TGT TAT CGG ATG TCA G	
Rad F3b Seq-R4	TGA CTG CAC ACT AAT CGA C	
Rad F3b Seq-R5	TTG AGA CAT GTG GAG ACA G	
Rad F4 Seq-L	TAC CTT AGA TGA CCT GTG	
Rad F4 Seq-L2	CGT TGC AGC TTG TGA GTG	
Rad F4 Seq-L3	CCT TGA TCC ACA TCA TCG	
Rad F4 Seq-L4	GGT GGA AGG ATC ATT CTG CA	
Rad F6 Seq-L	GCC ATG AAC CTT ACA AAC AG	
Rad F6 Seq-R	CAG TAA CCA ACA ATG GCA TG	
Rad F6 Seq-R2	TAT CTC TGA GCG CTT CTG AC	
Rad F7 Seq -R	CTG ACT TCT CTT GAT CTT GTG	
Rad F8 Seq-L	TGT GTG CGC GTG CAA G	
Rad F8 Seq-R	GAC GCA AAC ATA ACA AGG	
cRad Seq-L	GTT TCG AAG GCT ATA TTG GAG	
cRad Seq-R	GGG TTC CAA GTA CAT CGA	
cRad Seq-L2	GAA AGA GAT TCA GCC ATC AG	
cRad Seq-R2	CAG ATA TCT GTT CCT TCT CAC	
Rad50 SP5	GAA AGG CCA GGA GAA CTT CCA G	5'/3' RACE
Rad50 SP1b	TCT TGT GCT TGG TCC TTG TG	
Rad50 SP2b	TTG GAT TCG TCT TGG TGC AC	
Rad50 SP3b	ATC AGC GCA TCT GTA GCT GAG	
RadSth3-L2	CAA GAT CAA GAG AAG TCA GA	Sondas para Southern Blot
RadSth3-R2	TTT CCT ATT TCG CGT GTT G	
Rad50 dif-L2	TCA TGC CAT TGT TGG TTA CT	Localización cromosómica
Rad50 dif-R2	AGA TTA CTA GTT GGG TGT GT	
SSCP Rad-L	TAG GAA AGG CCA GGA GAA C	SSCP
SSCP Rad-R5	CAC AGT ACC ACC TCC AGA	
qRad -L	GCA TAA GAG TGC TGC ATT TTT C	RT-PCR cuantitativa
qRad-R	AGA TGC AGC ATA CAA CAG AAA GA	
Rad TH-L	CCG GAA TTC ATG AGC ACG GTG GAC AAG A	Doble híbrido
Rad TH-R2	CCG GAA TTC TTA GTC AAA TAT CTC TTG GGC	

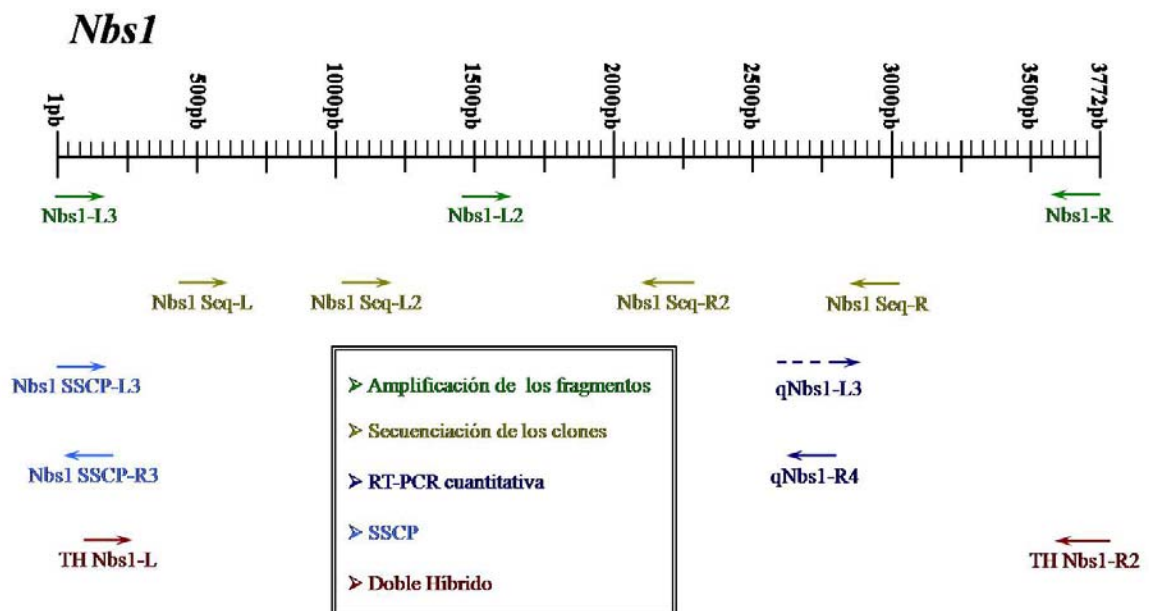
- **GAA TTC**: diana para la enzima *EcoRI*



III.3. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS SOBRE *Nbs1*

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilidad
Nbs-L2	CAT TGA CAC CTG AGC TCC	Amplificación de secuencias
Nbs-R	CAT CGG CAA CCG GTG AG	
Nbs-L3	GCC ACG GAA CAT CTG GAC	
Nbs Seq-L	TTG GGA TTC AGA TAT GCT G	Secuenciación de clones
Nbs Seq-R	TTC TCT ATG ACC TGA ACA TC	
Nbs Seq-L2	CTT CTT CCC TGC TCA CAC	
Nbs Seq-R2	TCA AGC CCT CTT CAT CTA G	
Nbs1-SP5	CGT GTC TGG AAA CAG CTT CAA GG	Sondas para Southern Blot
Nbs-R	CAT CGG CAA CCG GTG AG	
SSCP Nbs-L3	GCC ACG GAA CAT CTG GAC	SSCP
SSCP Nbs-R3	GTG CCG ACG GGG GTC AG	
qNbs-L3	TTG AAC CAC CTG CTT ACA TGA	RT-PCR cuantitativa
qNbs-R4	CAT CAG AAT CCG CCA CAA TA	
Nbs1 TH-L	TCT CTT GAA TTC ATG GTC TGG GCG CTG ACC	Doble híbrido
Nbs1 TH-R2	AGT TTG CTC GAG TCA TCG GCA ACC GGT GAG C	

- **GAA TTC**: diana para la enzima *EcoRI*
- **CTC GAG**: diana para la enzima *XhoI*



II.4. OLIGONUCLEÓTIDOS CON OTROS USOS

Nombre	Origen	Secuencia (5'→3')	Utilidad
T3	Se encuentran en varios vectores de clonación de uso común	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	Secuenciación de clones y control de insertos por PCR
T7		GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	
SK		CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC	
KS		TCG AGG TCG ACG GTA TC	
M13/pUC Fw		TGT AAA ACG ACG GCC AGT	
M13/pUC Rev		CAG GAA ACA GCT ATG ACC	
SP6		ATT TAG GTG ACA CTA TAG	
pLexA-L	Plásmido pGilda	CGT CAG CAG AGC TTC ACC ATT G	Doble Híbrido
pLexA-R		CGT TTT AAA ACC TAA GAG TCA C	
pB42AD-L	Plásmido pB42AD	AGC CTC TTG CTG AGT GGA GAT G	
pB42AD-R		CAA GGT AGA CAA GCC GAC AAC C	
GUS-L	Gen <i>Gus</i> (β-glucuronidasa)	CTT ACG CTG AAG AGA TGC TCG	Análisis de cebada transgénica mediante las técnicas de PCR y Southern Blot
GUS-R		TAA TAA CGG TTC AGG CAC AGC	
35S-L	Promotor 35S	TCG TGG AAA AAG AAG ACG TTC	
I-SceI-L1	Gen <i>I-SceI</i> (enzima de restricción I-SceI)	ATC CAG TAC TGT ACC TAG	
I-SceI-R		CCA TCA TCC ATG AAC CAG	
I-SceI-L4		AGG TAA TGA ACC TGG GTC	
K3	Gen <i>NptII</i> (resistencia a kanamicina)	CCA AGC TCT TCA GCA ATA TC	
K4		CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC	
Bar-Fw	Gen <i>Bar</i> (fosfinotricina acetil transferasa)	GTC TGC ACC ATC GTC AAC C	
Bar-Rev		GAA GTC CAG CTG CCA GAA AC	
Hyg-L	Gen <i>Hph</i> (resistencia a higromicina)	AGC CTG ACC TAT TGC ATC TCC	Sondas en qRT-PCR
Hyg-R		GCC TCC AGA AGA AGA TGT TGG	
probe #138	<i>Universal probe library</i> (Roche)	TGGTGGAT	
probe #88		CATCCTCC	
probe #131		ACCACCAG	
pTa794	Gerlach y Dyer, 1980	Secuencia 5S rRNA	Sonda en FISH

Anexo III – ALINEAMIENTOS DE PROTEÍNAS

[illegible]

[illegible]

Alineamiento de las proteínas MRE11 procedentes de los distintos genomas de trigo 1. T. monococcum; 2. T. aestivum cv. 'Vitron' (A); 3. T. aestivum cv. 'Vitron' (B); 4. Ae. tauschii; y de especies relacionadas 5. O. sativa; 6. Z. mays; 7. A. thaliana. Por separado se alinearon con la proteína humana y de S. cerevisiae (líneas 8 y 9, respectivamente). El color rojo y el asterisco indican aminoácidos idénticos, el color verde y los dos puntos indican sustituciones conservadas y el color azul y el punto indican sustituciones semi-conservadas. El signo + sobre las secuencias indican las diferencias entre las proteínas de trigo. Los dominios encontrados en las proteínas se indican mediante cajas sombreadas.

Las alineamientos se llevaron a cabo a través de la página web http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html.

[illegible]

Anexo III – Alineamiento de Proteínas

[illegible]

Alineamiento de las proteínas RAD50 procedentes de los distintos genomas de trigo 1. T. monococcum; 2. Ae. tauschii (D); 3. T. turgidum cv. 'Vitron' (B); 4. T. turgidum cv. 'Vitron' (A); y de especies relacionadas 5. O. sativa; 6. A. thaliana. Por separado se alinearon con las anteriores las secuencias de la proteína humana y de S. cerevisiae (líneas 7 y 8, respectivamente). El color rojo y el asterisco indican aminoácidos idénticos, el color verde y los dos puntos indican sustituciones conservadas y el color azul y el punto indican sustituciones semi-conservadas. El signo + sobre las secuencias indican las diferencias entre las proteínas de trigo. Los dominios encontrados en las proteínas se indican mediante cajas sombreadas. Los alineamientos se llevaron a cabo a través de la página web http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html.

[illegible]

Alineamiento de las proteínas NBS1 procedentes de los distintos genomioms de trigo y de otras especies relacionadas. 1. T. monococcum (A); 2. T. turgidum cv. 'Vitron' (B); 3. Ae. tauschii (D); 4. T. turgidum cv. 'Vitron' (A); 5. O. sativa; 6. Z. mays; 7. A. thaliana.. El color rojo y el asterisco indican aminoácidos idénticos, el color verde y los dos puntos indican sustituciones conservadas y el color azul y el punto indican sustituciones semi-conservadas. El signo + sobre las secuencias indican las diferencias entre las proteínas de trigo. Los dominios encontrados en las proteínas se indican mediante cajas sombreadas.

Anexo IV – PUBLICACIÓN

Characterization of the gene *Mre11* and evidence of silencing after polyploidization in *Triticum*

Alfredo de Bustos · Ruth Pérez · Nicolás Jouve

Received: 22 June 2006 / Accepted: 21 December 2006 / Published online: 30 January 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The MRE11 protein is a component of the highly conserved MRN complex, along with RAD50 and NBS1. This complex is crucial in the repair of breaks in double stranded DNA, and is involved in many other cell processes. The present paper reports the molecular characterization of *Mre11* gene in all three genomes of wheat, making use of the diploid species *Triticum monococcum* (genome A) and *Aegilops Tauschii* (genome D), the tetraploid *T. turgidum* (genomes A and B), and the hexaploid *T. aestivum* (genomes A, B and D). The genomic sequences characterized ranged from 4,662 to 4,766 bp in length; the cDNA corresponding to the processed mRNA was 2,440–2,510 bp long. In all cases, *Mre11* coded for a highly conserved protein of 699 amino acids with a structure involving 22 exons. *Mre11* expression was determined by real-time PCR in all the species analysed. The tetraploid species showed an expression similar to that of the diploid *Ae. tauschii* and lower than that of *T. monococcum*. Stronger expression was detected in the hexaploid *T. aestivum*. The SSCP technique was modified by introducing fluorescent labelling to the procedure in order to analyse the expression of the different *Mre11* genes (i.e., those belonging to the different genomes) in the polyploid species. In both polyploids, the *Mre11* gene belonging to the B genome was the least expressed. This probably reflects a first

step in the process of silencing duplicate genes after polyploidization.

Abbreviations

DSB	Double stranded breaking
HR	Homologous recombination
MRN	Protein complex formed by the <i>Mre11</i> , <i>RAD50</i> and <i>NBS1</i> protein
SSCP	Single stranded conformational polymorphism

Introduction

The MRE11 protein is a key player in the repair of double stranded DNA breakages (DSBs). *RAD50* and *NBS1* are also essential in this process (D'Amours and Jackson 2002). The proteins encoded by these genes form a protein complex known as MRN, which is involved in virtually all aspects of DNA metabolism, including DSB detection, DSB processing, homologous recombination, meiosis, and telomere maintenance (Hopfner et al. 2001; Van den Bosch et al. 2003; Assenmacher and Hopfner 2004). Mutations in these genes lead to hypersensitivity to methyl methane sulphonate (MMS) and ionizing radiation, and impede homologous and illegitimate recombination (Furuse et al. 1998; Uziel et al. 2003) as well as the DSB-activated cell cycle checkpoint response (Assenmacher and Hopfner 2004). Functional studies have shown that this complex interacts with the DNA break points in sister chromatids to maintain the original structure and favour repair (Van den Bosch et al. 2003). The protein encoded by *Mre11* is the core protein of the complex (D'Amours and Jackson 2002) and possesses binding

Communicated by E. Guiderdoni.

A. de Bustos · R. Pérez · N. Jouve (✉)
Department of Cell Biology and Genetics,
University of Alcalá, Campus Universidad de Alcalá,
28871 Alcalá de Henares (Madrid), Spain
e-mail: nicolas.jouve@uah.es

sites for both RAD50 and NBS1 (Assenmacher and Hopfner 2004). It is also able to form dimers with itself. The protein consists of two separable functional domains with nuclease activity at the N terminal region and a double stranded (ds) DNA binding site in the C terminal domain (Furuse et al. 1998). Nuclease activity is due to the phosphoesterase motifs; these form a nuclease domain with 3'–5' dsDNA exonuclease activity and single stranded (ss) DNA endonuclease activity (D'Amours and Jackson 2002).

Mre11 is highly conserved (Matthew et al. 2004; Hartung and Puchta 2004). It has been characterized in many organisms ranging from unicellular fungi to vertebrates (D'Amours and Jackson 2002). In plants, information on this gene is mostly available in the context of sequenced whole genomes; its molecular characterization has only been undertaken in *Arabidopsis thaliana* (Hartung and Puchta 1999). Despite the great importance of this gene, no studies have analysed its expression in plants.

The study of duplicate genes and their relationship with allopolyploidy is now a matter of much discussion. In recent years, the rapidly increasing number of complete genomes and incomplete genomic sequences available has permitted the study of evolutionary biology on the basis of comparative genomics (Hartung and Puchta 2004). One of the main revelations of this kind of study is that genome doubling (polyploidy) has been an important force in evolution, especially in plants (for a review, see Adams and Wendel 2005). All higher plants appear to have undergone several rounds of polyploidy during their evolution (Bowers et al. 2003; Paterson et al. 2004; Blanc and Wolf 2004a). For example, the genomes of *Arabidopsis thaliana* and rice showed up to 90 and 62% of duplicated genes (respectively) and it has been estimated that duplication of genes has occurred in 70–80% of angiosperm species (Simillion et al. 2002; Blanc et al. 2003; Bowers et al. 2003; Paterson et al. 2004). In some cases one of the duplicate genes has been lost after doubling (pseudogenization), while the other has maintained their original function or even acquired new roles (neofunctionalization). Hughes (1994) suggested that the change in the functions of duplicated genes could be due to complementary mutations that alter one or more subfunctions (subfunctionalization model). Theoretical and experimental studies in the past few years have led to a rethinking of the paradigm of duplicate genes that provided the conceptual foundations of studies on duplicate gene evolution (Moore and Purugganan 2003, 2005; Blanc and Wolf 2004a, b).

Triticum is a genus in which polyploid species arose from the merging of diploids and also newly formed

polyploid (to get to the hexaploid for example), most of which still coexist. These species belong also to the *Aegilops* genus as the D genome progenitor *Ae. tauschii* and the putative B donor *Ae. speltoides*. The speciation process of the wheat group has occurred recently (Huang et al. 2002) from a common ancestor that diverged into the different diploid species around 2.5–6 million years ago (Chantret et al. 2005 and cites herein). The tetraploid species *T. turgidum* appeared around 0.5–3 million of years ago, and the hexaploid species *T. aestivum* ssp. *spelta* and *T. aestivum* L just 7,000–9,000 years ago. Wheat provides an interesting model by which the first steps in the fate of duplicated genes can be examined. The aim of this work was to study the structure of the *Mre11* genes in polyploid wheats, and to analyse their expression in order to advance in our understanding of the evolutionary dynamics operating on these genes. This should provide information useful in directing gene targeting, and thus improve plant transformation technology.

Materials and methods

Plant material

The molecular characterization of the *Mre11* genes of the diploid species *Triticum monococcum* L. (genome A) and *Aegilops Tauschii* Coss. (genome D), the tetraploid species *Triticum turgidum* L. cv. Vitron (genomes A and B), and the hexaploid wheat *Triticum aestivum* L cv. Chinese spring (genomes A, B and D) was undertaken. All the material proceeds from our own plant stocks.

DNA and RNA isolation

Genomic DNA was purified from young leaves following the method of Sharp et al. (1988). RNA was isolated from pollen mother cells. Immature spikelets were collected at the meiosis stage, using the morphological development of the flower organs as an indicator of the development of the microspores. Anthers were collected at the microspore mid to late mononucleate stage (confirmed microscopically). Total RNA was purified using Tripure reagent (Roche) following the manufacturer's recommendations. To eliminate contaminating DNA, the RNA was purified using the Turbo DNA-free Kit (Ambion).

Amplification and cloning of sequences

Two pairs of primers were used to amplify the genomic sequence: Mre11-L/Mre11-R2 (5' TGCCATCTG

GGCTACATGGA 3' and 5' AACAAGAGGCCAT GA AATGAG 3' respectively), and Mre11-L2/Mre11-R (5' CGATTGGTCAGAAGTATG 3' and 5' GAGAATCATCTCCTCTTGAC 3'). The Mre11-L primer included the start codon and the Mre11-R included the stop codon. The primers Mre11-R2 and Mre11-L2 were designed over the 12th intron and the 12th exon, respectively. PCR reactions were performed in a volume of 50 µl containing 100 ng of genomic DNA, 0.2 µM of each primer, 400 µM of each dNTP, 2.5 U of PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene) and 1× PfuTurbo DNA polymerase buffer. All reactions were performed in a T3 thermocycler (Biometra). The reaction conditions were one cycle of 5 min at 95°C, 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 52–50°C (for the first and second pair of primers, respectively), 3 min at 72°C, and a final extension cycle of 7 min at 72°C. The amplified fragments were cloned into the *EcoRV* site of the BlueScript plasmid (Stratagene) and sequenced using an ABI Prism 377 sequencer (Applied Biosystems).

First strand cDNA synthesis was performed using 5 µl of DNA-free RNA (~2 µg input RNA) using the Transcriptor Reverse Transcriptase and Oligo (dT)₁₅ primer (Roche) following the protocol provided by the manufacturer. To obtain the cDNA *Mre11* sequences, 2 µl of first strand cDNA was subjected to PCR with the Mre11-L and Mre11-R primers. The PCR reaction, cloning and sequence procedures were as indicated above. Complete cDNA sequences were obtained using the RACE kit (Roche) following the manufacturer's recommendations. For 5' RACE, the primers SP1 (5' CCAAATGTTCAAGAACAGA 3'), SP2 (5' CCATGGATAGTGAACACAGG 3') and SP3 (5' CACTGACAACCTGGAACCTTCAC 3') were used. SP5 primer (5' ATTCGCAGTGAGGAGGTGGAC 3') was used for 3' RACE.

Southern blotting

This experiment was carried out to address the number of copies of these genes. Genomic DNA (20 µg) from the diploid, tetraploid and hexaploid wheat species was digested with *HindIII* and *EcoRI* restriction endonucleases (that cut only once in the genomic sequence of these genes) and size-fractionated in 1% agarose gel. Fragments were blotted onto nylon membranes (Roche). A fragment of the *Mre11* gene obtained by PCR was labelled with digoxigenin (Roche) and used as a probe. Hybridization was performed at 65°C; the detection of hybridization was performed according to the manufacturer's recommendations (Roche).

Alignment and sequence analyses

The analysis of the DNA sequences obtained was performed using the Sequence Navigator programme (Applied Biosystem). DNA and deduced protein sequences were aligned using the Clustal W 1.5 program (Thompson et al. 1994). The alignment of MRE11 included sequences obtained in this study and others previously published of rice (XP474032), *A. thaliana* (T52564), humans (AAC78721) and *S. cerevisiae* (NP013951). Phylogenetic trees were constructed using the distance method of the PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6 (Felsenstein 2004). Distance matrices were computed using the two-parameter method of Kimura (1980) with the PROTDIST program. Distance trees were constructed by the neighbour-joining method Saitou and Nei (1987).

Real-time quantitative PCR

Real-time PCR was used to analyse the expression of the *Mre11* genes. Two pairs of primers were designed using the Primer Express program (Applied Biosystem). The pair QPCR-L2/QPCR-R2 (5' CCCACAA AGTGGACGGAAGA 3' and 5' GCTTGGCATGG AACCAGTGT 3') amplified a fragment of about 100 bp in the cDNA of *Mre11*. The pair 18S RNA-L/18S RNA-R (5' AATTGTTGGTCTTCAACGAGG AA 3' and 5' AAAGGGCAGGGACGTAGTCAA 3') amplified a fragment of similar size in the cDNA of the 18S rRNA gene that was used as an endogenous control in PCR reactions. All reactions were performed using the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem). For the *Mre11* gene, reactions were performed in a volume of 30 µl containing 3 µl of cDNA obtained as described above (about 300 ng of input RNA), 900 nM of each primer, and 1X SYBR Green mix (Applied Biosystem). For 18S rRNA amplification, the primer concentration used was 166 nM. The reaction conditions were 10 min at 95°C, 40 cycles of 95°C for 15s, and 60°C for 1 min. The specificity of the amplifications was analysed by gel electrophoresis using the same PCR conditions described above. This specificity was further analysed in each real-time PCR reaction using ABI Prism Dissociation Curve Analysis Software. Duplicate samples were used in all reactions and each experiment was performed in triplicate. For this purpose, from the same RNA, three independent RT reactions were made and the cDNA obtained was used to perform real-time PCR following the same procedure described above.

The amplification efficiency of *Mre11* and the 18S rRNA genes was determined as described by Li et al.

(2004). The cDNA of both genes was serially diluted twofold to obtain a standard curve. The relative changes in the expression of *Mre11* were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method where C_t indicates the threshold cycle that is the fractional cycle number at which the amount of amplified target reaches a fixed threshold (Livak and Schmittgen 2001). ΔC_t indicates the difference in threshold cycles for target and control genes. This is carried out to normalize the amount of target gene related to an endogenous gene (housekeeping). Finally, $\Delta\Delta C_t$ indicates the amount of target, normalized to an endogenous reference, and relative to a calibrator.

SSCP analysis

A fluorescence SSCP technique was developed based on the radioactive technique described by Cronn and Adams (2003). The modifications made consisted mainly of amplification with fluorescence-labelled primers and the use of an automatic sequencer. First, amplification of *Mre11* cDNA was performed using primers SSCP-L (5' AGAGGTAAATCTGTAGCA GC 3') and SSCP-R2 (5' GGATCTGAATTTTCAAC AACTTC 3') without labelling. PCR was performed in a reaction volume of 30 μ l, including 2 U of Taq polymerase and 1 \times buffer (Sigma), 100 μ M dNTPs, 0.3 μ M of each primer, and 1 μ l of cDNA. The PCR cycling conditions consisted of an initial incubation for 2 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 57°C and 30 s at 72°C, plus a final extension step at 72°C for 5 min. The amplified products were loaded onto agarose gels and purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). After purification, the products were internally fluorescently labelled with 6 FAM by PCR using the same primers as above. The main difference with the above PCR conditions was that a single primer was used in each reaction. These were performed using 0.5 μ M of the single labelled primer in a volume of 10 μ l containing 0.6 U and 1 \times Taq Buffer (Sigma), 175 μ M dNTPs, and 5–8 ng of purified DNA fragment. The PCR cycle was as above. The reaction volumes were then diluted (1:10) and 5 μ l of each were mixed with 20 μ l of formamide and 0.5 μ l of standard Rox500 (Applied Biosystems). Fluorescence analysis was performed in an ABI 3130 Avant Genetic Analyzer using a 50 cm capillary array and a performance-optimized polymer (POP-7) (Applied Biosystems). The manufacturer's default settings were used except for temperature (18°C) and time (3,500 s). Analyses were performed in triplicate and cDNA was synthesized. The proportion of each transcript was related to the fluorescence area of each peak obtained.

Results

Molecular characterization

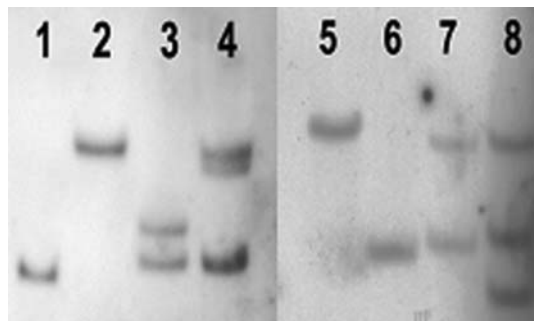
The genomic characterization of the *Mre11* gene was performed in the diploid species *T. monococcum* (genome A) and *Ae. tauschii* (genome D), in the tetraploid *T. turgidum* (genomes A and B) and in the hexaploid *T. aestivum* (genomes A, B and D). Two sets of primers were designed to amplify two fragments covering the entire genomic sequence. These were designed based on previously published sequences of the *Mre11* genes of *Arabidopsis thaliana* and rice. Information of sequences from the EST databank on wheat and closely related species was also used. All the above mentioned sequences were used to perform an alignment. Primers were designed in the EST sequences of wheat or in the most conserved regions of *Arabidopsis* and rice sequences. The fragments obtained were cloned, and the clones of each species sequenced. In the case of diploid species, no variation was observed between the clones. However, in the tetraploid *T. turgidum*, two types of sequences were found, and it was assumed that each belonged to a different genome. The assembly of the partial sequences of the two fragments amplified for each species provided the whole genomic sequence. The sizes obtained ranged from 4,662 for *T. turgidum* (genome A) to 4,766 bp for *Ae. tauschii* (genome D) (Table 1). A more detailed description of the gene sequences is available in the data bank (the accession number of each sequence is presented in Table 1)

Southern blotting was performed to determine the *Mre11* copy numbers. The genomic DNA of *T. monococcum*, *T. turgidum*, *Ae. tauschii* and *T. aestivum* was digested with two restriction enzymes (see [Materials and methods](#)) and probed with an *Mre11* fragment (Fig. 1). In all cases, Southern blotting revealed strong hybridization signals according to the number of genomes of each species, indicating that there is only one copy of the gene per genome in the wheat species analysed. In agreement with the nomenclature rules for the homoeologous genes of the three genomes of the allohexaploid wheat, the denominations *Mre11A*, *Mre11B* and *Mre11D* are proposed to distinguish the *Mre11* gene of each. This nomenclature is used from here on.

To characterize the different *Mre11* genes, their mRNAs were isolated when the microspores were at the meiosis stage. cDNA was obtained as described in [Materials and methods](#). Amplification reactions were performed using cDNA and the specific *Mre11* primers (*Mre11-L* and *Mre11-R*) to obtain the complete *Mre11*

Table 1 Sizes of the DNA sequences of the wheat *Mre11* genes characterized

Specie	Genome	Size of genomic DNA (bp) (accession number)	Size of cDNA+ UTR (bp) (accession number)	Size of 5' UTR (bp)	Size of 3' UTR (bp)
<i>T. monococcum</i>	A	4,678 (AM049169)	2,457 (AM049175)	87	289
<i>T. turgidum</i> cv. Vitron	A	4,662 (AM049171)	2,510 (AM049174)	174	234
<i>T. turgidum</i> cv. Vitron	B	4,719 (AM049172)	2,440 (AM049173)	145	199
<i>Ae. tauschii</i>	D	4,766 (AM049170)	2,456 (AM049176)	73	283

**Fig. 1** Southern blot analysis of *Mre11* copy numbers. DNA from *T. monococcum* (genome A), *Ae. tauschii* (genome D), *T. turgidum* cv. Vitron (genomes A and B) and *T. aestivum* cv. Chinese spring (genomes A, B and D) was digested with *Eco*RI and *Hind*III and hybridized with a *Mre11* probe. Lanes 1–4, DNA digested with *Eco*RI (in the same order as above); lanes 5–8, DNA digested with *Hind*III

cDNA sequences of the diploid and tetraploid wheat species. A single fragment of around 2,100 bp was amplified in all species analysed. After the fragments were cloned, several clones of each species were sequenced once more. No differences were found between clones of the same species, except for the tetraploid species that showed two types of sequence. One of these was related to the sequence found in *T. monococcum* (genome A); it was assumed that the second (which had more differences) belonged to the B genome. RACE experiments were also performed to obtain the sequence at the 3' and 5' cDNA ends. The size of the total cDNA sequences characterized ranged from 2,440 to 2,510 bp (genomes B and A, respectively) (Table 1).

The differences found between the coding regions of the cDNA sequences were all due to single nucleotide substitutions; no insertions or deletions were detected. These differences show the great similarity between the *Mre11* genes of the different wheat genomes: 98% of identity for *Mre11A* and *Mre11D*, and 97% of identity for both genes with respect to *Mre11B*. The comparison between genomic and cDNA sequences confirmed the presence of 22 exons in all the genomes. A characteristic of these genes appears to be the finishing of the

first exon at the ATG start codon. The size of each exon was the same in all the sequences characterized, with exon 19 the largest at 74 codons. The size of the introns showed slight variation between the sequences analysed due to single nucleotide substitutions and insertions/deletions. Thus, the shortest intron was intron 5 with 71 bp in all the sequences characterized, while intron 16 was the largest, with a size varying between 466 bp in *Mre11A* to 477 bp in *Mre11D*. The open reading frame of the *Mre11* genes was the same size for all the sequences, with 2,097 bp coding for a 699 amino acid protein (estimated molecular weight around 78 kDa, theoretical pI 5.9).

Protein alignment

Protein alignment was performed to compare the deduced amino acid sequences for the different wheat species analysed, and to compare them with others previously published (Fig. 2). The alignment showed the very high conservation of the proteins encoded by the *Mre11* genes; a percentage of identity of 99% was seen between the species of wheat analysed. Conservation was also strong in the other species included in the alignment analysis, especially in the N-terminal region where the phosphodiesterase motifs are located. Overall, the MRE11 protein of rice showed 92% of identity with those of wheat, which in turn showed 84% of identity with the corresponding protein of *A. thaliana*. Homology with human and yeast *Mre11* was lower (60 and 57%, respectively).

The alignment results were used to build a phylogenetic tree (Fig. 3) showing the relationship between all the proteins analysed. The strongest similarity was found between proteins belonging to the A genome of *T. monococcum* and *T. turgidum*. These proteins were closely related to their genome D counterparts in *Ae. squarrosa* and their genome B counterparts in the tetraploid *T. turgidum*. As expected, the evolutionary proximity between rice and wheat led to the rice protein showing more similarity with wheat proteins than with the protein of *A. thaliana*. The most distant proteins were those from yeasts and humans.

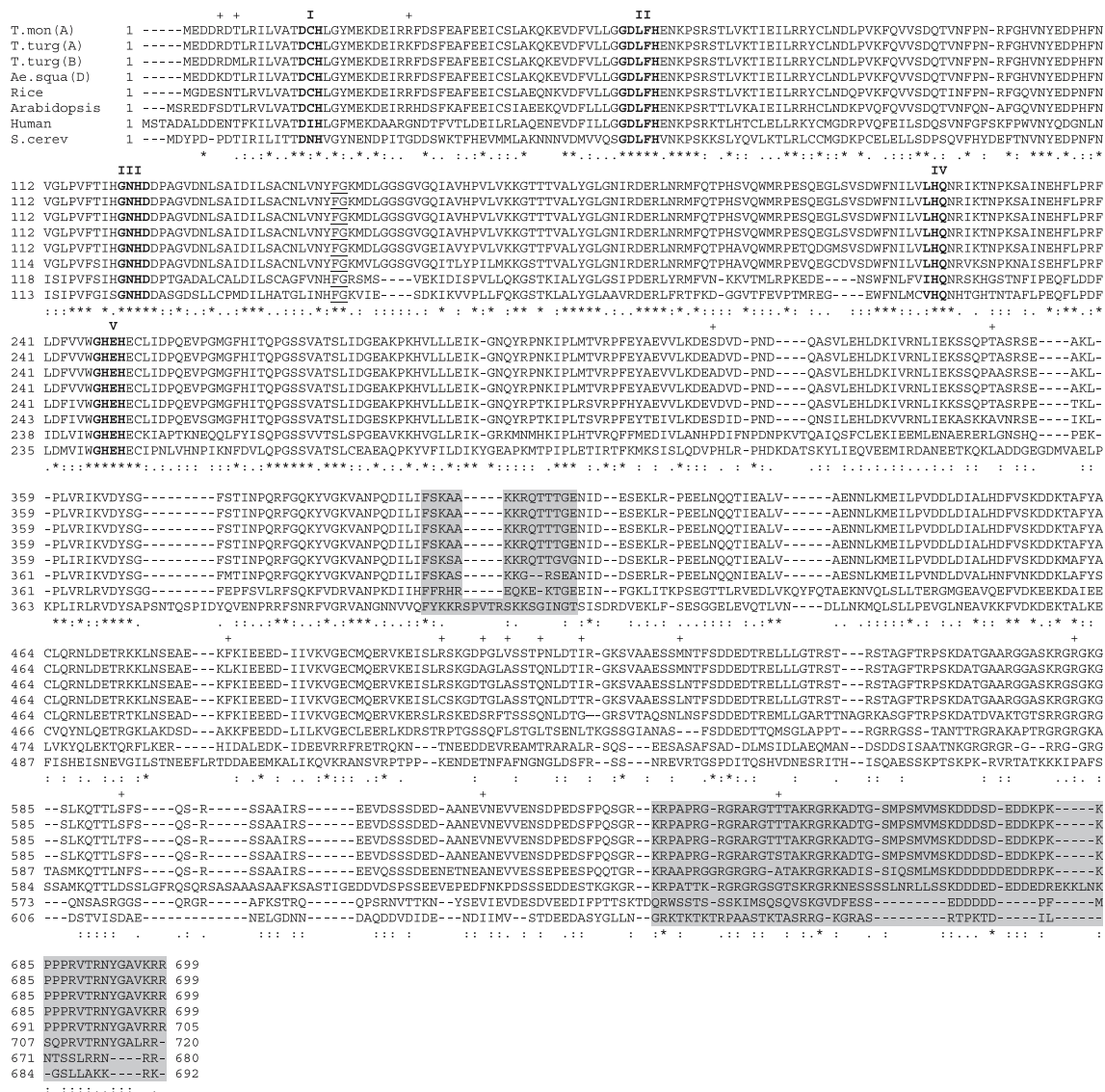


Fig. 2 Alignment of proteins encoded by the *Mre11* genes of the wheat species analysed and of previously published MRE11 of rice (XP474032), *A. thaliana* (T52564), humans (AAC78721) and *S. cerevisiae* (NP013951). The differences between the wheat proteins are denoted by the *plus* sign in the upper part of the alignment. In the lower part, *asterisk* indicates positions that have a

single, fully conserved residue, and *dot* and *colon* indicate positions that have a single or two different residues, respectively. **Bold letters** indicate the five highly conserved phosphodiesterase motifs. Underlined letters denote the hydrophobic cluster. *Shaded regions* indicate the two DNA binding sites of MRE11

Analysis of the expression of the *Mre11* genes by real-time PCR

In a preliminary study, several genes were evaluated as internal controls. Thus, primers for alcohol dehydrogenase, polyubiquitin, puoindoline-b and the *18S rRNA* genes were designed as described in [Materials and methods](#) and their expression tested in the different species of wheat examined (data not shown). The 18S ribosomal gene showed the smallest variation in expression and was selected as a housekeeping gene in all real-time PCR experiments.

The efficiency of amplification was determined by making serial dilutions of Mre11 cDNA as described in [Materials and methods](#). In a first test, the designed Mre11 primers showed different amplification efficiency to that of the primers for the *18S rRNA* gene. A second pair of Mre11 primers was then designed and the amplification efficiency obtained was very similar to that of 18S rRNA primers ($P = 0.058$, $R^2 = 0.1970$).

To ensure that the differences in expression were not due to differences in developmental stage, a pool of mRNA from different plants was obtained for each species analysed. Checks were performed by microscopy

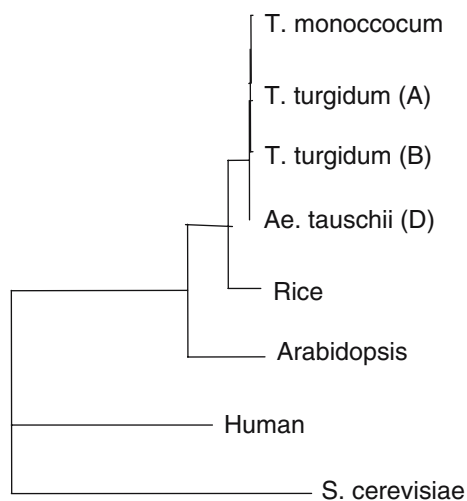


Fig. 3 Phylogenetic tree obtained from the deduced amino acid sequences of *Mre11* in the wheat species studied and in others (previously published data)

to confirm the microspore stage of the plant tissues from which this mRNA came. Table 2 shows the expressions obtained. The average expression of the two samples of *Mre11* and *18S* used in each real-time PCR reaction was calculated, and the ΔCt determined. This was performed for three replicates. The highest ΔCt obtained was for the diploid species *Ae. tauschii*, the hexaploid *T. aestivum* had the lowest. The other diploid species, *T. monoccocum*, had a higher ΔCt value than the hexaploid wheat, but a lower value than that shown by the tetraploid *T. turgidum*; the latter had a ΔCt value similar to that of the diploid *Ae. tauschii*. Figure 4a shows the differences in the expression of the wheat species. The species with the lowest expression was *Ae. tauschii*, which was used as a calibrator. The hexaploid species showed an *Mre11* expression six times that of the diploid *Ae. Tauschi*. The diploid *T. monoccocum* also showed a higher expression value than the calibrator (2.08-fold greater), whereas the expression of the tetraploid species was slightly higher (1.67-fold greater).

To analyse the intraspecific expression of the *Mre11* genes, three plants of each species were studied in the same way as described above (Table 3). The plants of *T. monoccocum* analysed showed variation in ΔCt . In plant 1, expression was similar to that seen in the hexaploid plants assayed, while plant 3 had a ΔCt value similar to the plants of *Ae. tauschii* and *T. turgidum*. The highest ΔCt value was that of plant 3 of *Ae. tauschii* (16.60). The other plants of this species showed levels of expression similar to that shown by the individual samples of *T. turgidum*. The plants of the tetraploid species showed the smallest range of variation in expression of the gene. The hexaploid plants analysed showed the smallest ΔCt values, with a minimum of 13.49 for plant 1. Figure 4b shows the variation of expression for all the individual plants analysed. Plant 3 of *Ae. tauschii* showed the weakest expression and was used as a calibrator. The maximum level of expression was found in the plants of *T. aestivum* (4.5- to 8.6-fold greater than the calibrator), with expression in the *Ae. tauschii* and *T. turgidum* plants very similar. The expression values for the *T. monoccocum* plants were intermediate.

SSCP analysis

The SSCP technique was used to analyse the relative expression of homoeologous genes in each polyploid wheat species. To evaluate the accuracy of the modified SSCP fluorescence technique, known amounts of the transcripts of *Mre11A* and *Mre11B* of *T. turgidum* were analysed in the same way as reported by Cronn and Adams (2003), who assumed that the level of expression observed with this technique agrees with the quantity of transcript used. The unlabelled SSCP-L and SSCP-R2 primers described in Materials and methods annealed within the cDNA clones of the *Mre11* genes to amplify a fragment of 237 bp. The A and B genome fragments were identical in size but differed in nine substitutions, yielding a pairwise nucleotide identity of 96.2%. Mixtures of purified A and B

Table 2 Results of real-time PCR expression analysis performed using pooled RNA

Specie	Replicate 1			Replicate 2			Replicate 3			Avg. $\Delta Ct \pm SD$
	Avg. Ct <i>Mre11</i>	Avg. Ct <i>18S</i>	ΔCt	Avg. Ct <i>Mre11</i>	Avg. Ct <i>18S</i>	ΔCt	Avg. Ct <i>Mre11</i>	Avg. Ct <i>18S</i>	ΔCt	
<i>T. monoc</i>	29.88	14.55	15.33	30.58	14.99	15.59	30.64	14.76	15.88	15.6 ± 0.27
<i>Ae. Tausch</i>	30.97	14.34	16.63	31.34	14.4	16.94	31.08	14.65	16.43	16.66 ± 0.25
<i>T. turgid</i>	29.98	14.37	15.61	30.79	14.68	16.11	30.28	14.24	16.04	15.92 ± 0.27
<i>T. aestiv</i>	28.57	14.88	13.69	29.14	15.18	13.96	28.43	14.44	13.99	13.88 ± 0.16

The Ct values are indicated for the *Mre11* and *18S rRNA* genes in three replicates. The normalized Ct (ΔCt) was calculated for each experiment and the average determined for the three experiments

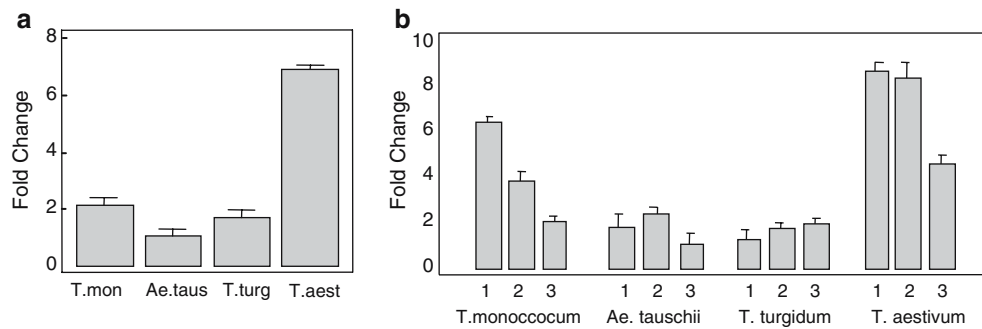


Fig. 4 **a** Fold change in gene expression of the pool of RNA obtained for the four wheat species used. The calculation of fold change was performed according to $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001) as indicated in **Materials and methods**. The lower ΔC_t value obtained (from *Ae. tauschii*) was used as calibrator.

b Changes in the expression of *Mre11* gene in the individual plants studied. To perform the calculation of the fold change, the lower value of ΔC_t of plant 3 belonging to *Ae. tauschii* species was used as calibrator

Table 3 Expression levels in individual plants

Species	Replicate 1			Replicate 2			Replicate 3			Avg. ΔCt ± SD
	Avg. Ct Mre11	Avg. Ct 18S	ΔCt	Avg. Ct Mre11	Avg. Ct 18S	ΔCt	Avg. Ct Mre11	Avg. Ct 18S	ΔCt	
<i>T. monoc</i>										
1	28.65	14.67	13.98	28.20	15.05	14.15	28.32	14.67	13.65	13.92 ± 0.25
2	30.30	14.83	15.47	29.00	15.66	14.26	29.31	14.97	14.34	14.69 ± 0.67
3	30.56	14.67	15.98	31.09	15.66	15.43	30.20	14.78	15.42	15.58 ± 0.26
										14.73 ± 0.83
<i>Ae. Tausch</i>										
1	32.01	14.72	15.29	31.45	15.99	15.46	30.69	15.06	15.63	15.79 ± 0.60
2	31.89	14.40	15.49	30.89	15.87	15.02	31.20	15.63	15.57	15.36 ± 0.29
3	33.30	14.54	16.76	31.54	15.53	16.01	31.57	15.47	16.10	16.60 ± 0.53
										15.91 ± 0.62
<i>T. turgidum</i>										
1	31.97	14.43	15.54	31.54	15.66	15.86	29.63	14.66	14.97	15.45 ± 0.45
2	31.03	14.45	15.58	31.71	15.68	16.03	30.42	14.62	15.80	15.80 ± 0.22
3	31.02	14.74	15.37	30.04	15.55	15.89	30.41	14.92	15.49	15.58 ± 0.27
										15.61 ± 0.17
<i>T. aestivum</i>										
1	27.88	14.73	13.15	29.52	15.56	13.96	28.41	15.04	13.37	13.49 ± 0.41
2	28.91	14.54	14.37	28.07	14.87	13.20	27.67	14.62	13.05	13.54 ± 0.72
3	29.23	14.57	14.66	29.62	14.91	14.71	28.61	14.70	13.91	14.42 ± 0.44
										13.81 ± 0.52

Data are the results obtained for the three replicates performed. The average expressions of each individual plant and of the three plants of each species are indicated

PCR products were then made up for SSCP analysis in the following ratios (8 μ l volume): 5 ng A + 0.05 ng B (100:1), 5 ng A + 0.25 ng B (20:1), 5 ng A + 0.71 ng B (7:1), 5 ng A + 1.66 ng B (3:1), 5 ng A + 5 ng B (1:1), 1.66 ng A + 5 ng B (1:3), 0.71 ng A + 5 ng B (1:7), 0.25 ng A + 5 ng B (1:20), and 0.05 ng A + 5 ng B (1:100). In addition, 5 ng of fragments A and B were used separately as controls. For each mixture, three independent labelling reactions were performed.

In this technique, gene expression is related to the area of the automatically obtained fluorescence peak. Expression values were obtained by calculating the average of the three replicates. Corrections for background

were sometimes required for the 1:20 and 1:100 dilutions. Figure 5 shows the results for one of the replicates for each of the experiments performed. The technique clearly separates two peaks in each mixture, representing the transcripts of the *Mre11* genes of genomes A and B. The technique showed good reproducibility, as revealed by the very small standard deviations observed (Table 4). The 95% confidence intervals (CI) were calculated and the fractional expected ratios were well within the 95% CI calculated on observed signal ratio except for the 1:7 dilution. Fluorescence SSCP analysis of tetraploid *T. turgidum* genomic DNA was also performed to validate the method (data not

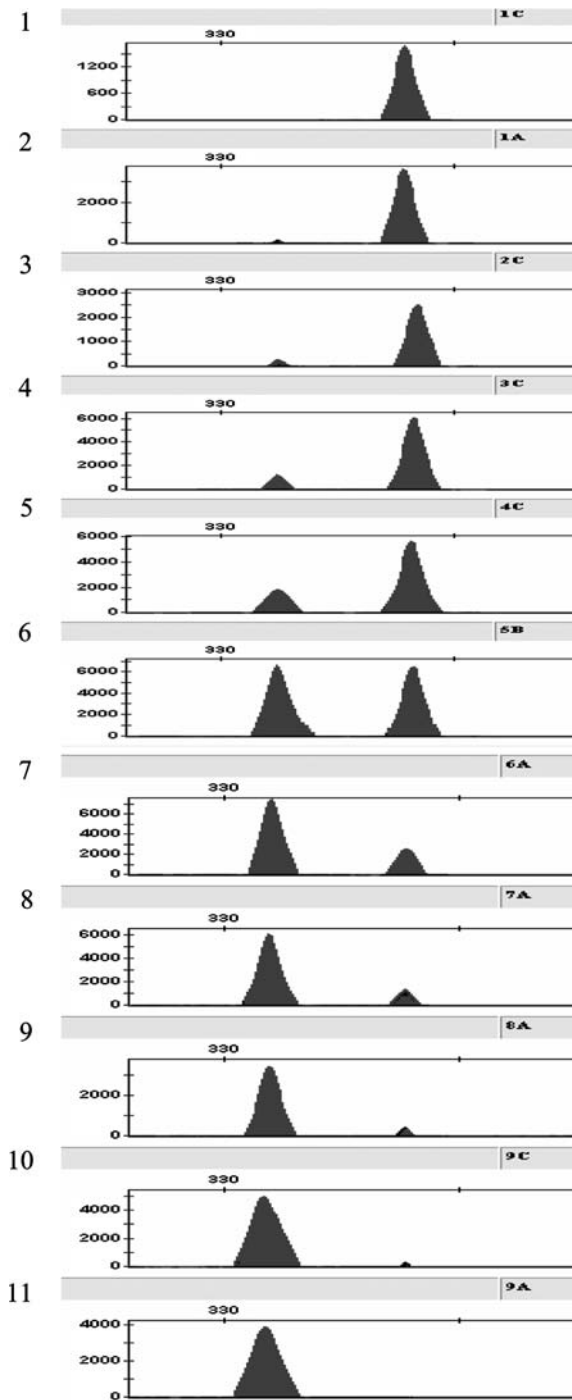


Fig. 5 Expression of *Mre11* as determined by automatic fluorescence analysis of one of the three replicates of each of the nine dilutions tested. Controls of the expression of the A and B genome genes were included (*I* and *II*, respectively): 2 = 1:100; 3 = 1:20; 4 = 1:7; 5 = 1:3; 6 = 1:1; 7 = 3:1; 8 = 7:1; 9 = 20:1; 10 = 100:1

shown). Identical levels of fluorescence would be expected for both genes. Values of 44.6 and 55.4%, close to those expected for the genes *Mre11A* and *Mre11B*, were obtained.

Table 4 Expression of *Mre11* belonging to the A and B genomes for the nine dilutions tested, and the confidence intervals obtained

Known dilution ratio	Fractional expected ratio	Observed signal ratio (\pm SD)	95% Confidence interval
1:100	0.010	0.016 ± 0.010	−0.010 to 0.042
1:20	0.048	0.030 ± 0.014	0.006–0.067
1:7	0.125	0.112 ± 0.004	0.101–0.124
1:3	0.250	0.237 ± 0.008	0.215–0.259
1:1	0.500	0.492 ± 0.008	0.471–0.514
3:1	0.750	0.755 ± 0.004	0.743–0.766
7:1	0.875	0.875 ± 0.002	0.869–0.881
20:1	0.952	0.952 ± 0.001	0.949–0.956
100:1	0.990	0.987 ± 0.003	0.979–0.996

The technique was then used to analyse the relative expression of homoeologous genes in the tetraploid species *T. turgidum* (AABB) using the diploid species *T. monococcum* (AA) and *Ae. tauschii* (DD) as controls. For this, pooled RNA was used to obtain cDNA. Three independent RT-PCR and labelling reactions were performed for each species. Figure 6 shows the results of one replicate. In this case, the fluorescence technique discriminated two peaks belonging to the A and B genomes. In agreement with Adams et al. (2003), the expression of the transcripts was considered biased when the transcript ratio for the two homoeologous genes was 60/40 or greater. As can be seen, biased expression of both genes was detected in the samples of *T. turgidum* analysed, the value for the *Mre11A* gene higher ($69.4\% \pm 0.72$) than that for *Mre11B* ($30.5\% \pm 0.70$). This technique was also able to distinguish between the transcripts of hexaploid *T. aestivum* (AABBDD) (Fig. 6). Thus, three different peaks were clearly resolved, corresponding to the three genomes of cultivated wheat. In this case, transcript expression was considered to be approximately equal if the transcript ratio for the three genes was around 33%. The expression of the *Mre11* genes of *T. aestivum* also showed differences between the three genomes, with higher values for the *Mre11A* and *Mre11D* genes ($42.2 \pm 0.62\%$ and $38.4 \pm 2.0\%$, respectively), again showing lower expression of the *Mre11B* gene (19.3 ± 1.8).

To assess the variation in expression within the polyploid species, three plants from *T. turgidum* and *T. aestivum* were studied. Table 5 shows the results obtained. Variation between plants was seen in the tetraploid species. Plant 1 showed expression values similar to those obtained in the analysis of the pooled RNA, with a great difference in the expression of the genes of the A and B genomes. The other two individuals analysed

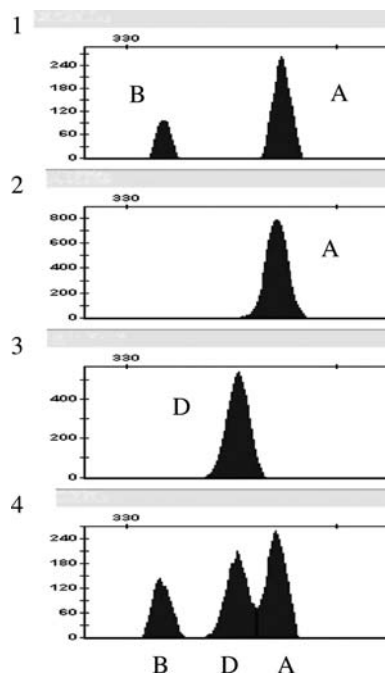


Fig. 6 Results of the fluorescence SSCP analysis of *Mre11* performed with *T. turgidum* (1), *T. monoccocum* (2), *Ae. tauschii* (3) and *T. aestivum* (4). Transcripts from the A, B and D genomes were identified

did not show clearly biased expression, although the expression of *Mre11A* was slightly higher than that of *Mre11B*. The expression of *Mre11* in individual plants of *T. aestivum* showed similar values. In all cases, *Mre11B* showed the weakest expression, with an average of 25.52 CT, slightly higher than the observed for the pooled RNA. The expressions of *Mre11A* and *Mre11D* differed slightly between plants but were similar to one another; in some cases that of *Mre11A* was

stronger (plants 1 and 3), in others that of *Mre11D* was stronger (plant 2). These values were similar to that observed for the pooled RNA.

Discussion

The MRN complex is highly conserved, and genes orthologous to *Mre11* have been found in all taxonomic groups examined (Petrini et al. 1995; Hopfner et al. 2001; Van den Bosch et al. 2003). The MRE11 protein shows reasonable homology between organisms, indicating that the recombination machinery is an old complex that has been conserved during evolution (Hartung and Puchta 2004). This property allowed the use of combined comparative genomic strategies to isolate these genes in the wheat species analysed. Therefore, for the amplification of the *Mre11* genes, primers were designed using information on the orthologous genes of rice and *A. thaliana*, and from the EST database for wheat, barley and rye. This kind of strategy is currently being used in the characterization of genes in species for which no information on the sequence of the genome is available. The same method was previously used to characterize orthologous genes coding for the HMW glutenins in several species of *Triticum*, *Secale* and *Aegilops* (De Bustos et al. 2000, 2001; De Bustos and Jouve 2003, 2006).

Firstly, the hexaploid wheat ‘Chinese Spring’ (ABD genomes) was used to amplify the *Mre11* genes of the three genomes. However, the PCR experiments performed using different pairs of primers did not produce fragments of different size; only one fragment was obtained in all cases. This precluded the use of nulli-

Table 5 Results of SSCP analysis for the polyploid *T. turgidum* (A and B genomes) and *T. aestivum* (A, B and D genomes) plants

Individual plant	Genome	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Avg. expression (SD)
<i>T. turgidum</i> 1	A	68.60	71.08	74.49	71.93 (2.95)
	B	31.30	28.91	25.50	28.58 (2.91)
<i>T. turgidum</i> 2	A	56.13	58.00	57.72	57.28 (1.00)
	B	43.86	41.99	42.28	42.71 (1.00)
<i>T. turgidum</i> 3	A	55.35	54.49	50.08	53.30 (2.82)
	B	44.64	45.50	49.13	46.43 (2.38)
<i>T. aestivum</i> 1	A	38.69	36.09	41.08	38.61 (2.49)
	B	25.83	29.25	27.74	27.60 (2.93)
	D	35.47	34.64	31.16	33.75 (2.28)
<i>T. aestivum</i> 2	A	38.04	36.80	37.41	37.41 (0.62)
	B	21.74	21.87	24.04	22.55 (1.29)
	D	40.21	41.26	38.53	40.00 (1.37)
<i>T. aestivum</i> 3	A	37.67	41.89	37.70	39.08 (2.42)
	B	27.77	22.25	26.56	25.52 (2.90)
	D	34.55	35.84	35.73	35.37 (0.71)

Values are the percentage expression of the *Mre11* genes for the genomes of each sample (three replicates). The average *Mre11* expression for each genome is also indicated

tetrasomic lines to assign the gene a chromosome location. The diploid species *T. monoccocum* (genome A) and *Ae. tauschii* (genome D), and the tetraploid *T. turgidum* (genomes A and B), have all been used in the characterization of the orthologous genes of the three genomes of wheat (Johnson and Bhavé 2004). *T. monoccocum* was chosen because it is thought to be very close to the A genome of cultivated wheat and *Ae. tauschii* is the donor of D genome (Zohary and Feldman 1962). However, the identity of the diploid donor of the B genome is still a matter of discussion, although some authors suggest that *Ae. speltoides* is the current diploid species with the most similar genome to the B genome of cultivated wheat (Petersen et al. 2006; De Bustos and Jouve 2006). In the absence of diploid species carrying the primitive B genome, we used tetraploid wheat, assuming that two different sequences would be characterized from this species, one corresponding to the *Mre11A* gene of *T. monoccocum* and the other matching *Mre11B*. The comparison of the two sequences obtained with that belonging to genome A of *T. monoccocum* allowed the identification of the one belonging to the genome B.

The localization of these genes in the chromosomes of wheat was also attempted using fluorescence in situ hybridization (FISH). However, no results were obtained due to the technical difficulties in mapping low-copy number genes in large plant genomes such as that of wheat (Jiang and Gill 1994). Neither was any mapping information available on ESTs of this gene (GrainGenes wEST Resource, <http://www.wheat.pw.usda.gov/wEST/>). New strategies are therefore needed to map the loci of these genes.

Southern experiments were performed to determine the number of copies of this gene in each species. The results show that there was only a single copy of the *Mre11* gene per genome. This contrasts with that reported in humans, in which a pseudogene has also been detected (Petrini et al. 1995). The wheat results agree with the existence of the single *Mre11* sequence for the plant species available in the EST databank (Hartung and Puchta 2004).

The proteins encoded by the *Mre11* genes of the different wheat species showed characteristics similar to those of other species. The five phosphodiesterase motifs, plus the hydrophobic cluster typical of these proteins, have been found in the amino terminal region of MRE11 protein (Usui et al. 1998; Hopfner et al. 2001; Matthew et al. 2004). The nuclease activity of this protein is specified by the phosphodiesterase motifs. A 3'–5' double stranded DNA with exonuclease activity and single and double stranded DNA endonuclease activity has been reported (D'Amours and Jackson

2002). The central and C-terminal regions contain additional DNA binding sites as well as a binding site for RAD50 and for MRE11-MRE11 dimerization (Assenmacher and Hopfner 2004).

The *Mre11* genes characterized showed strong conservation of coding sequences and exon/intron structures. This conservation was also found in the comparative analysis of this gene in plants and animals, where the intron positions were identical in more than 35% of cases (Hartung and Puchta 2002). The similarity between the sequences of the genes of the wheat studied here was 97–98%. Similarity reached 99% when comparing the proteins. This strong conservation of these genes indicates the important functional role of the proteins for which they code (Ciaffi et al. 2006). However, a clear difference in the degree of conservation is seen when comparing the conservation of these genes with that of other genes of the same genomes. Thus, the wheat genes coding for the *Glu1* endosperm proteins showed more variation than the *Mre11* genes (De Bustos et al. 2000; Kawaura et al. 2005). The sequences characterized from the A genome of *T. monoccocum* and *T. turgidum* showed the greatest similarity, and were also very similar to those of genomes B and D. This close relationship supports the generally accepted hypothesis of a common ancestor for the three genomes of wheat (Bowden 1959; Löve 1984).

Mre11 expression

Real-time PCR is widely used for the quantification of mRNA and is a critical tool in basic molecular research, with applications in biomedicine and biotechnology (Bustin 2002). This technique has also been used in many plant studies (Gachon et al. 2004), including the analysis of gene expression in wheat (Yan et al. 2003; Li et al. 2004; Huang et al. 2004). An important feature in the use of this technique is the normalization of the RNA content between samples. This is often achieved using an endogenous control gene expressed at nearly constant levels in all the samples analysed (Brunner et al. 2004). The choice of the best candidate for this function is of great importance. In the present work, four genes amply used in this kind of study were analysed: those coding for alcohol dehydrogenase, puromidine-b (Li et al. 2004), polyubiquitin, and 18S ribosomal RNA (Brunner et al. 2004). With the exception of the 18S rRNA housekeeping gene, those tested showed variation, and in some wheat species the polyubiquitin gene could not be amplified. In the present study, only the 18S rRNA gene was

expressed at the same level for all the plant species analysed, and was used as a control because the samples were not enriched in mRNA, and because the *Mre11* gene is weakly expressed in the meiosis stage (Bustin 2000).

The comparison of *Mre11* expression between wheat species was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001). To apply this method, the amplification efficiency of the target and the endogenous control must be approximately equal. In the present case it was necessary to test different pairs of primers in order to amplify *Mre11* with efficiency similar to that seen for the amplification of the *18S rRNA* gene. The degree of similarity in amplification efficiency is obtained from the slope in linear regression analysis (Livak and Schmittgen 2001). If the value of the slope is close to zero, the efficiencies are similar. In the present work, the value $P = 0.058$ permitted the use of this method for analysing the relative expression of *Mre11*.

Mre11 expression was analysed using a pool of mRNA for each species. Although there are many studies comparing the level of expression between diploid species, to our knowledge this is the first time that the relative expression of a gene has been compared between species with different levels of ploidy. The hexaploid *T. aestivum* showed the strongest expression and the diploid *Ae. tauschii* the weakest. The other two species presented intermediate levels of expression showing the diploid *T. monoccocum* greater expression than the tetraploid *T. turgidum* (this species showed a degree of expression more similar to that of the other diploid species). The hexaploid species expressed *Mre11* over six times more than the diploid *Ae. tauschii*, and three times more than the tetraploid. In addition, the expression of the tetraploid was intermediate between the two diploid species. This could be attributed to differences in the development stage of the samples. However, the pooling of mRNA from different plants and the microscopically confirmed developmental stage of the material indicate this variation to have some other cause.

When the analysis was extended to individual plants, the variation in expression observed was even higher than that seen in the first experiment, although overall the variation of expression between species was similar. These results could suggest the existence of a complex mechanism of expression and silencing duplicate *Mre11* genes; this complexity probably related to the great importance of this gene. Alternatively, a lack of fine control of expression between duplicate genes is also possible.

SSCP analysis

Most higher eukaryotes have genomes with redundant genes, mainly arising from genome doubling or polyploidy (Adams et al. 2003). Differences in the expression levels of duplicate genes have long been a subject of great interest since new genes can arise from redundant duplicates (Li et al. 2005). The accurate assessment of the expression of each member of a homoeologous gene pair is therefore of great importance. Such analysis requires a technique that can discriminate between the expressions of two (or more) almost identical genes (homoeologues). Northern blotting, the most commonly used technique in gene expression analysis, has, however, frequently failed in this area. Recently, Cronn and Adams (2003) developed a useful PCR-SSCP technique for the characterization and quantification of the relative expression of homoeologous genes in polyploid cotton. We modified this technique to improve some of the negative aspects associated with the use of radioactive products.

The fluorescence SSCP technique described here conserves the advantages of radioactive labelling (Cronn and Adams 2003), but this was replaced by fluorescence. To determine the efficiency of the technique, known amounts of transcript were used to compare the expression level of the genes using the original technique (Cronn and Adams 2003). The results were highly reproducible, as shown by the non-significant differences found between the replicates. Another advantage of fluorescence SSCP is that the process is less time-consuming. Moreover, it eliminates the dangers associated with the use of radioactive compounds, as well as the use of acrylamide gels. In addition, the results are obtained automatically in less than an hour, thus avoiding lengthy exposure times (sometimes several days) and obviating the need to measure band intensities. When the modified technique was used to analyse the expression of homoeologous genes in polyploid species, it showed itself to be a powerful tool. This is the first time that the analysis of the expression of homoeologous genes has been achieved in hexaploid species. This technique should be valuable in the study of the expression of homoeologous genes in other species at least as complex as hexaploid wheat.

The expression of the *Mre11* genes in meiosis was not the same for all the genomes of the polyploid species, especially for the B genome. The results obtained clearly show a different expression level for *Mre11B* with respect to *Mre11A* and *Mre11D* in both the tetraploid and hexaploid species. The weaker expression of *Mre11B* would have a greater impact in the tetraploid than in the hexaploid species, in which the A and D

genomes are expressed at a similar level. This result shows that no relationship exists between the level of expression of the genes studied and the ploidy level of the species. However, it remains unexplained why the diploid species show differences in their expression of *Mre11* (in *T. monoccocum* [A] twice that seen in *Ae. tauschii* [D]). This could be explained by the action of other epigenetic factors (Lee and Chen 2001). This is suggested by the similar expression of the genes *Mre11A* and *Mre11D* in the hexaploid species, in which the maintenance of the differences in the expression of the genes observed in the diploids should be expected (Adams et al. 2003), especially when it is remembered that *T. aestivum* is of recent origin (estimated as appearing around 8,000 years ago) (Huang et al. 2002).

The individual plants analysed in both polyploid species showed a slight variation in *Mre11B* expression. This would indicate that the variation in the level of expression of these homologous genes at meiosis stage is an ongoing process that started after the recent polyploidization of wheat species (Blanc and Wolf 2004b; Chantret et al. 2005). The expression level might also be influenced by environmental or biological factors and also it can be variable between organs of the same plant (Adams et al. 2003, 2004). There is no clear reason why *Mre11B* is more weakly expressed in polyploids than the genes belonging to the other genomes, although similar results have been also reported for the expression of the α/β -gliadin genes of the B genome (Kawaura et al. 2005). It should be borne in mind that the B genome diverged from the common ancestor before the A and D genomes (Quian Gu et al. 2004); at present it is the genome with the greatest genetic diversity (Wendel 2000). This could be related to the differences observed in the expression of the analysed genes.

After polyploidization, a progressive process of adjustment may have occurred to compensate for the level of expression of the orthologous genes in the allopolyploid species. This may have taken place via the reduction or even silencing of some of the duplicated genes. Following genome duplication, changes in the expression of many of duplicate genes are produced, leading to different levels of expression, silencing or even the elimination of some genes (Adams et al. 2003; Blanc and Wolfe 2004a, b; Chantret et al. 2005). Hughes (1994) proposed a model, referred to as subfunctionalization, which suggests that duplicate genes acquire debilitating yet complementary mutations that alter one or more subfunctions of the original genes, or in the more frequently occurring loss-of-function mutations in regulatory regions (Force et al. 1999). Subsequent empirical studies on expression

divergence between duplicate genes suggest that changes in expression regimen occur both frequently and rapidly, consistent with the predictions of the subfunctionalization model. This model might be especially convincing for the orthologous genes of the allopolyploid species. Functional divergence can occur rapidly after allopolyploidization. This phenomenon has been demonstrated in both naturally and in synthetic polyploids. For instance, among 40 homoeologous duplicate genes in natural tetraploid cotton, nine gene pairs exhibited biased expression, with the homeolog from one parental genome contributing more to the transcription than the other (Adams et al. 2003). Wang et al. (2004) studied the changes in duplicate gene expression between siblings of multiple selfed generations of synthetic *Arabidopsis* allopolyploids. They found that duplicate gene silencing is rapid and can vary stochastically between siblings. They also show that the silencing is potentially controlled by DNA methylation.

In the allopolyploid wheats these changes may have occurred soon after polyploidization or several generations after doubling, perhaps in connection with epigenetic factors (Adams and Wendel 2005). The observed expression of *Mre11B* would indicate the initiation of a process of silencing after polyploidization. This has been observed for some duplicated genes involved in DNA repair in *A. thaliana*, which have been selectively lost (Blanc and Wolfe 2004b). The analysis carried out has been performed at meiosis stage, in which the activity of the *Mre11* genes is critical. It would be interesting to extend the analysis to other tissues and different developmental stages to confirm if different copies of homoeologous genes issued from duplication have undergone a subfunctionalization process or are not regulated in the same way either in spatial or temporal dimensions in the allopolyploid wheats.

Acknowledgments The authors would like to thank Yolanda Loarce for carefully reading the manuscript and Juan M. González for assistance in checking the state of development of the microspores. We also thank the MCYT (*Ministerio de Ciencia y Tecnología*) of Spain for its financial support of this work (Grants No. AGL2003-08128-C02), and Adrian Burton for linguistic assistance. Alfredo De Bustos is supported by the *Ramón y Cajal* Programme of the MCYT.

References

- Adams KL, Wendel JF (2005) Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends Genet* 21(10):539–543
- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4649–4654

- Adams KL, Percifield R, Wendel JF (2004) Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* 168:2217–2226
- Assenmacher N, Hopfner KP (2004) MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113:157–166
- Blanc G, Wolfe KH (2004a) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* 16:1667–1678
- Blanc G, Wolfe KH (2004b) Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution. *Plant Cell* 16:1679–1691
- Blanc G, Hokamp K, Wolfe KH (2003) A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Res* 13:137–144
- Bowden WL (1959) The taxonomy and nomenclature of the wheats, barleys, and ryes and their wild relatives. *Can J Bot* 37:657–684
- Bowers J, Chapman BA, Rong J, Paterson AH (2003) Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422:433–438
- Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression. *BMC Plant Biol* 4:14
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169–193
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol. Endocrinol* 29:23–39
- Chantret N, Salse J, Sabot F, Arman S, Bellec A, Laubin B, Dubois I, Dossat C, Sourdille P, Joudrier P, Gautier MF, Católico L, Beckert M, Aubourg S, Weissenbach J, Caboche M, Bernard M, Leroy P, Chalhoubb B (2005) Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *The Plant Cell* 17:1033–1045
- Ciaffi M, Paolacci AR, D'Aloisio E, Tanzarella OA, Porceddu E (2006) Cloning and characterization of wheat PDI (protein disulfide isomerase) homoeologous genes and promoter sequences. *Gene* 366:209–218
- Cronn RC, Adams KL (2003) Quantitative analysis of transcript accumulation from genes duplicated by polyploidy using cDNA-SSCP. *Biotechniques* 34:726–734
- D'Amours D, Jackson SP (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:317–327
- De Bustos A, Jouve N (2003) Characterization and analysis of new HMW-glutenin alleles encoded by *Glu-R1* locus of *Secale cereale*. *Theor Appl Genet* 107:74–83
- De Bustos A, Jouve N (2006) Characterisation and phylogenetic analysis of the genes coding for high molecular weight glutenin subunits in three diploid species of *Aegilops*. *Int J Plant Sci* 167(2):359–366
- De Bustos A, Rubio P, Jouve N (2000) Molecular characterization of the inactive allele of the gene *Glu-A1* and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenin subunits of wheat. *Theor Appl Genet* 100:1085–1094
- De Bustos A, Rubio P, Jouve N (2001) Characterisation of two gene subunits on the 1R chromosome of rye as orthologs of each the *Glu-1* genes of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 103:733–742
- Felsenstein J (2004) PHYLIP (phylogeny inference package, version 3.6). Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J (1999) Conservation of duplicate genes by complementary degenerative mutations. *Genetics* 151:1531–1545
- Furuse M, Nagase Y, Tsubouchi H, Murakami-Murofushi K, Shibata T, Ohta K (1998) Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J* 17:6412–6425
- Gachon C, Mingam A, Charrier B (2004) Real-time PCR: what relevance to plants studies? *J Exp Bot* 55(402):1445–1454
- Hartung F, Puchta H (1999) Isolation of the complete cDNA of the Mre11 Homologue of *Arabidopsis* (accession no. AJ243822) indicates conservation of DNA recombination mechanisms between plants and other eukaryotes. (*PGR* 99–132). *Plant Physiol* 121:312
- Hartung F, Puchta H (2002) Intron gain and loss in the evolution of the conserved eukaryotic recombination machinery. *Nucleic Acids Res* 30:5175–5181
- Hartung F, Puchta H (2004) What comparative genomics tell us about the evolution of eukaryotic genes involved in recombination. *Curr Genomics* 5:109–121
- Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP, Tainer JA (2001) Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105:473–485
- Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P (2002) Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci* 99:8133–8138
- Huang XZ, Ling-Zhu W, Zheng-Qiang MA (2004) Cloning and characterization of a ubiquitin fusion degradation protein gene in wheat. *Acta Botanica Sinica* 46(11):1366–1372
- Hughes AL (1994) The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 256:119–124
- Jiang K, Gill BS (1994) Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* 37:717–725
- Johnson JC, Bhavne M (2004) Molecular characterisation of the protein disulphide isomerase genes of wheat. *Plant Sci* 167:397–410
- Kawaura K, Mochida K, Ogihara Y (2005) Expression profile of two storage-protein gene families in hexaploid wheat revealed by large-scale analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiol* 139:1870–1880
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of nucleotide substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J Mol Evol* 16:111–120
- Li WH, Yang J, Gu X (2005) Expression divergence between duplicate genes. *Trends Genet* 21(11):602–607
- Li Z, Hansen JL, Liu Y, Zemetra RS, Berger PH (2004) Using Real-Time PCR to determine transgene copy number in wheat. *Plant Mol Biol Rep* 22:179–188
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402–408
- Lee HS, Chen ZJ (2001) Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc Natl Acad Sci* 98(12): 6753–6758
- Löve A (1984) Conspectus of the Triticeae. *Feddes Report* 95:425–521
- Matthew AL, Gustausson K, Hopfner KP, Carson CT, Stracker TH, Karcher A, Felton D, Weitzman MD, Tainer J, Carney JP (2004) Structural and functional analysis of Mre11–3. *Nucleic Acids Res* 32(6):1886–1893

- Moore RC, Puruggannan MD (2003) The early stages of duplicate gene evolution. *Proc Natl Acad Sci* 100:15682–15687
- Moore RC, Puruggannan MD (2005) The evolutionary dynamics of duplicate genes. *Curr Opin Plant Biol* 8:122–128
- Paterson A, Bowers JE, Chapman BA (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc Natl Acad Sci* 101:9903–9908
- Petersen G, Seberg O, Yde M, Berthelsen K (2006) Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol Phyl Evol* 39:70–82
- Petrini JH, Walsh ME, DiMare C, Chen XN, Korenberg JR, Weaver DT (1995) Isolation and characterization of the human MRE11 homologue. *Genomics* 29:80–86
- Quian Gu Y, Coleman-Derr D, Kong X, Anderson OD (2004) Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes. *Plant Physiol* 135:459–470
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sharp PJ, Desai S, Gale MD (1988) Isozyme variation and RFLPs at the α amylase loci in wheat. *Theor Appl Genet* 76:691–699
- Simillion C, Vandepoele K, Van Montagu MC, Zabeau M, Van de Peer Y (2002) The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13627–13632
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Usui T, Ohta T, Oshiumi H, Tomizawa J, Ogawa H, Ogawa T (1998) Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* 95:705–716
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22:5612–5621
- Van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF (2003) The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep* 4(9):844–849
- Wang J, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L, Chen ZJ (2004) Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* 167:1961–1973
- Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol* 42:225–249
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Proc Natl Acad Sci* 100:6263–6268
- Zohary D, Feldman M (1962) Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Evolution* 16:44–61

Anexo V - SUMMARY

SUMMARY

ANTECEDENTS

A major focus of plant biotechnology over the last years is the development of improved tools for the genetic modification of crop plants. The ability to modify a resident gene *in situ* or to integrate a transgene at a specific genomic position in a controlled way is a central issue in this context. This process is known as “gene targeting”.

There are two possible ways for the integration of DNA molecules into genomes: non-homologous end-joining (NHEJ) or homologous recombination (HR). NHEJ joins sequences at the broken ends, which have little or no homology, in a non-conservative manner, and some genetic information is lost. HR, on the other hand, requires extensive tracts of sequence homology and is basically error-free. HR is the primary double-strand breaks (DSB) repair pathway in yeast and prokaryotes; but the targeted integration of a transgene into the endogenous homologous sequence in higher plants has been regarded to be in the order of 10^{-4} to 10^{-6} compared with random integration.

A variety of approaches have been tried in higher plants to overcome the barrier imposed by illegitimate recombination. One of the most effective means for enhancing the frequency of homologous recombination is to create a chromosome break at the target site. The break stimulates the cells DNA repair system, and in the presence of a homologous template repair proceeds through homologous recombination.

The processes of DNA repair and recombination have been studied for many years, and have revealed the molecular mechanisms underlying these processes showing on the one hand clear conservation of these processes in evolution, and on the other hand clear differences in their regulation among different organisms. The MRN (*Mre11*, *Rad50* and *Nbs1*) complex is a highly conserved protein complex and is a key player in the cellular response to DSBs and is involved in virtually all aspects of DNA end metabolism, including DSB detection, DSB processing, homologous recombination and meiosis, NHEJ, telomere maintenance and the DSB-activated cell cycle checkpoint response. Homologous of *Mre11* and *Rad50* are found in all kingdoms of life and are essential for genome integrity. Eukaryotic MRN contains a third component, *Nbs1* (or yeast *Xrs2*), that links the MRN complex to damage-induced cell cycle checkpoints.

METHODOLOGY

In the present work it has been addressed the study of different aspects of the homologous recombination processes in two high agronomic interest cereals, wheat and barley: on the one hand the mechanisms of homologous recombination in these cereals by means of DSBs induction; and on the other hand the complex MRN as a genetic system of great importance in all the processes of recombination.

In regard to the study of the recombination mechanisms, it has been tried to move to cereals a system already employed in model plants as *Arabidopsis* and tobacco. This system induces the formation of DSBs on target sequences on the plants genome and, at the same time, provides target homologous sequences in order to be used as templates. The efficiency of homologous recombination pathway in somatic plant cells is determined by monitoring the restoration of the GUS marker gene. The starting point for these assays is obtaining transgenic plants that contain the reporter constructions. It has been obtained so far transgenic barley and wheat plants via *Agrobacterium*-mediated transformation of immature embryos.

Regarding the study of MRN complex, it has been achieved a molecular characterization of *Mre11*, *Rad50* and *Nbs1* genes in all three genomes of hexaploid wheat, A, B and D, making use of the diploid species *Triticum monococcum* (genome A) and *Aegilops tauschii* (genome D), the tetraploid *T. turgidum* (genomes A and B), and the hexaploid *T. aestivum* (genomes A, B and D). Genomic sequences and the cDNA corresponding to the processed mRNA was isolated and sequenced. Southern blotting was performed to determine the genes copy numbers, and the localization of *Rad50* loci in the wheat chromosomes was carried out using FISH techniques. The expression rate was determined by real-time PCR in all the species analysed, and SSCP technique was modified by introducing fluorescent labeling to the procedure in order to analyse the expression of the different homeologous genes of polyploid species. Finally, two-hybrid assays were performed for detecting interactions between the different proteins to constitute the MRN complex.

CONCLUSIONS

1. We have designed an efficient technology for *Agrobacterium*-mediated transformation of immature embryos of barley. With this technique we have

obtained transgenic plants carrying the constructions pAR-ISceI, pIU.GUS and pDGU.US.

2. The molecular characterization of the *Mre11*, *Rad50* and *Nbs1* genes in wheat has demonstrated that there is only one copy of these genes per genome in wheat species analysed. The genes characterized showed strong conservation of sequences among homeologous genes, which indicates the important functional role of the MRN complex in the maintenance of the genome integrity.
3. The locus *Rad50* was located in the short arm of the chromosomes of the homology group 5 of wheat by means of FISH. This location has been confirmed by PCR analysis using two aneuploid lines.
4. The study of the expression of these genes by quantitative PCR has showed similar levels of global expression of the *Mre11*, *Rad50* and *Nbs1* genes in the diploid and tetraploid species. The hexaploid species *Triticum aestivum* presents a higher level of expression, what could be related to the major need of control of the recombination processes.
5. The expression of the *Nbs1* genes in meiosis in wheat is much higher than *Mre11* and *Rad50*, being similar in these last two cases. This increase in the expression can be related to the function of NBS1, taking part in an important cell-cycle checkpoint response pathway, as well as in the location of MRE11 and RAD50 in the break points.
6. The SSCP analysis has revealed that the relative expression of the homeologous *Mre11B* and *Nbs1B* is reduced in the polyploids species of wheat, which supposes a regulation of these genes expression after the hybridization processes that originated the tetraploid species *T. turgidum*.
7. The formation of the MRN complex implies the interaction between MRE11 to form homodimers, as well as the interaction of this one with RAD50 to give place to the M₂R₂ complex. By means of two-hybrid analysis it has seen that these interactions are independent from the coding genome. No interaction has been detected for the formation of homodimers RAD50-RAD50 neither NBS1-NBS1, as well as interactions MRE11-NBS1 not NBS1-RAD50.

